

Juliana Montagna Hartwig

**NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELO CLORETO DE
MANGANÊS: MODELO EXPERIMENTAL DE MANGANISMO
EM RATOS WISTAR**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica, da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Farina

Coorientadores: Dr^a. Danúbia Bonfanti
dos Santos de Godoi

Prof. Dr. Márcio Ferreira Dutra

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Hartwig, Juliana Montagna

Neurotoxicidade induzida pelo cloreto de manganês:
modelo experimental de manganismo em ratos Wistar /
Juliana Montagna Hartwig ; orientador, Marcelo Farina ;
coorientadora, Danúbia Bonfanti dos Santos de Godoi,
coorientador, Márcio Ferreira Dutra. - Florianópolis, SC,
2016.

74 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Cloreto de manganês. 3.
Neurotoxicidade. 4. Manganismo. 5. Estriado e globo
pálido. I. Farina, Marcelo. II. Godoi, Danúbia Bonfanti
dos Santos de. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

“Neurotoxicidade induzida pelo cloreto de manganês: modelo experimental de manganismo em ratos Wistar”

Por

Juliana Montagna Hartwig

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (008/PPGBQA/2016) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Carlos Peres Silva
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:



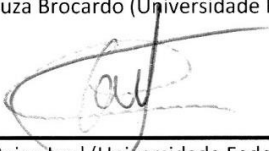
Dr(a) Marcelo Farina (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Rui Daniel Schröder Prediger (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Patrícia de Souza Brocardo (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Rodrigo Bainy Leal (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 29 de fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Sempre a Deus, em primeiro lugar, pelas oportunidades que Ele me proporciona, pelas conquistas, mas também pelas falhas que cometi, mas que me permitiram aprender, amadurecer e ser uma pessoa melhor, pessoal e profissionalmente;

A meus pais e irmão, os quais são o apoio necessário para que eu decida sempre qual o melhor caminho seguir, e são também o meu fôlego nos momentos em que é preciso de um ar extra para respirar e relaxar;

Ao meu orientador, o Professor Dr. Marcelo Farina, pela acolhida nestes 5 anos que estive no laboratório, desde os tempos de IC, que lecionou os seus ensinamentos, não somente didáticos, mas também para a vida, da melhor maneira possível;

À minha coorientadora, Dr^a Danúbia Bonfanti dos Santos de Godoi, que além de grande amiga, me ensinou a ser uma pessoa paciente e mais humilde, e demonstrou que sempre podemos contar com o próximo, estando perto ou longe;

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Márcio Ferreira Dutra, pelo auxílio nos momentos de dúvida e à Prof^a Dr^a. Patrícia de Souza Brocardo, pelo empréstimo do vibratomo, pelo auxílio nunca negado e pela amizade que se manterá;

Às companheiras de laboratório Dirleise Colle, que tive o privilégio de acompanhar durante a iniciação científica e obtive grandes instruções, e Viviane de Souza, que por pouco tempo foi minha IC, mas sua ajuda sempre foi de grande valia;

À Heloísa Ghizoni, Cinara Ludvig Gonçalves, Diones Caeran Bueno, Aline Aita Naime, Marina Ventura e Sthéfani Spricigo Portilho, Mariana Appel Hort, Alessandra Antunes do Santos e demais colegas de laboratório, pela amizade que temos e manteremos nos anos que seguirão, ademais, pela ajuda, que direta ou indiretamente, me auxiliaram no curso desde IC até este Mestrado e no desenvolvimento deste projeto;

Ao Prof. Dr. Rui Prediger, pelo empréstimo do rotarod e aos técnicos do LAMEB, por assessorarem na utilização dos equipamentos;

Aos colegas de corredor, pelas risadas, fofocas, bares e temakis pós expediente;

À CAPES, pelo fornecimento da bolsa, ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e aos professores deste curso, pela experiência aqui adquirida..

O meu mais sincero Muito Obrigada!

RESUMO

O Manganês (Mn) é um metal essencial extremamente importante para os sistemas biológicos. Contudo, a exposição excessiva ao Mn causa toxicidade a diversos órgãos/sistemas, incluindo o sistema nervoso central (SNC). O excesso de Mn pode levar à síndrome conhecida como *manganismo*, uma condição neuropatológica em que alguns sintomas se assemelham a aqueles encontrados na doença de Parkinson (DP) idiopática. Apesar das similaridades entre ambas as condições, há eventos específicos relacionados à intoxicação por Mn, dentre os quais destaca-se perda neuronal e gliose no globo pálido (GP) e estriado. O objetivo deste estudo foi investigar os possíveis efeitos neurotóxicos da exposição ao $MnCl_2$ em um modelo experimental em ratos Wistar de 3 meses de idade, o qual baseou-se na administração de 4 injeções intraperitoneais de uma solução de $MnCl_2$ (dose de 25 mg/kg), sendo administrada uma injeção por dia nos dias 1, 3, 5 e 7. Além disso, objetivou-se avaliar a potencial reversibilidade desta toxicidade através da realização de testes comportamentais, bioquímicos e imunohistoquímicos 24 h imediatamente após a última exposição ao $MnCl_2$ (dia 8), assim como depois de um período de latência de 30 dias. Vinte e quatro h após a última exposição ao Mn, observou-se uma significativa redução no número de cruzamentos e levantadas no teste do campo aberto e um significativo aumento no número de resvaladas no teste do *beam walking* nos ratos tratados com $MnCl_2$ quando comparados com animais do grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos nos níveis estriatais de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tióis não-proteicos (NPSH), na atividade das enzimas antioxidantes glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), nem na atividade dos complexos I e II da cadeia respiratória mitocondrial. A imunorreatividade para a enzima tirosina hidroxilase (marcadora de neurônios catecolaminérgicos, TH) diminuiu significativamente no estriado dos animais expostos ao Mn 24 h após o tratamento, tendo sido normalizada após à latência de 30 dias. Os níveis da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) foram significativamente aumentados apenas no globo pálido (GP) dos animais expostos ao Mn somente aos 30 dias após o tratamento. Não houve diferença na imunorreatividade para a enzima glutamato descarboxilase (marcadora de neurônios GABAérgicos, GAD 65). A reversão dos danos motores e da imunomarcção da TH revelam que há uma potencial reversibilidade que se segue após o término da exposição ao $MnCl_2$. Conclui-se que o desenho experimental deste trabalho se mostrou um bom modelo para se estudar os mecanismos que

levam ao manganismo, após uma intoxicação aguda por MnCl_2 . Ainda, a gliose reativa (aumento da reatividade da GFAP) observada no GP aos 30 dias após a exposição sugere a existência de um processo reativo/inflamatório tardio, o qual poderia ser responsável por eventos neurodegenerativos tardios decorrentes da exposição ao Mn.

Palavras-chave: Cloreto de manganês. Neurotoxicidade. Manganismo. Estriado. Globo pálido.

ABSTRACT

Manganese (Mn) is an essential metal extremely important for biological systems. However, the exposure to excessive Mn causes toxicity to various organ/systems, including the central nervous system (CNS). Importantly, excessive exposure to Mn can lead to the syndrome known as *manganism*, a neuropathological condition whose symptoms are similar to those found in idiopathic Parkinson's disease (PD). Despite the similarities between both conditions, there are specific events linked only to Mn intoxication such as neuronal loss and gliosis in the globus pallidus (GP) and striatum. The aim of this study was to investigate the potential neurotoxic effects of exposure to MnCl_2 in an experimental model with adult (3 months) rats, based on the administration of 4 intraperitoneal injections of MnCl_2 (dose of 25 mg/kg), being administered at days 1, 3, 5 e 7. In addition, we aimed to evaluate the potential reversibility of such toxicity by using behavioral, biochemical and immunohistochemical tests 24 hours immediately after the last exposure to MnCl_2 (at day 8), as well as after a 30 days latency period . Twenty-four h after the last Mn injection, there was a significant reduction in the number of crossings and rearings in the open field test, as well as a significant increase in footslips in the *beam walking* test on rats treated with MnCl_2 when compared to the control group. There were no significant differences in the striatal levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), nonprotein thiols (NPSH), in the activity of antioxidant enzymes glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD), as well as in the activities of complex I and II of the mitochondrial respiratory chain. Tyrosine hydroxylase (a marker of catecholaminergic neurons, TH) immunoreactivity decreased in the striatum of Mn exposed rats at 24 h after treatment, but it returned to control levels after the latency period. The glial fibrillary acidic protein (GFAP) levels increased only in GP at 30 days after Mn exposure. There was no difference in the immunoreactivity for glutamate decarboxylase (a marker of GABAergic neurons, GAD 65). The absence of the motor impairment and changes in TH immunostaining at 30 days after Mn exposure revealed the reversibility of symptoms triggered by MnCl_2 exposure. We conclude that the experimental design of this study represents a useful strategy to study the mechanisms that lead to manganism, especially after an acute exposure to MnCl_2 . Moreover, the observed reactive gliosis (increased GFAP reactivity) in the GP at 30 days after Mn exposure suggests the

occurrence of delayed reactive/inflammatory processes, which could be responsible for neurodegenerative events following Mn exposure.

Keywords: Manganese chloride. Neurotoxicity. Manganism. Striatum. Globus pallidus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Transporte do Mn para dentro do cérebro.....	20
Figura 2: Região afetada pela DP.....	23
Figura 3: Regiões afetadas pelos manganismo.....	25
Figura 4: Diagrama de Venn.....	26
Figura 5: Linha do tempo experimental.....	36
Figura 6: Efeitos do MnCl ₂ no peso corpóreo de ratos após 24 h e 30 dias de tratamento.....	43
Figura 7: Efeitos do MnCl ₂ no número de cruzamentos e de levantadas em ratos 24 h e 30 dias após tratamento.....	44
Figura 8: Efeitos do MnCl ₂ no teste do <i>beam walking</i> em ratos 24 h e 30 dias após tratamento.....	46
Figura 9: Efeitos do MnCl ₂ nos níveis estriatais de TBARS de ratos 24 h e 30 dias após o tratamento.....	48
Figura 10: Efeitos da exposição do MnCl ₂ sobre a imunomarcção da TH no estriado de ratos 24 h e 30 dias após o tratamento.....	51/52
Figura 11: Efeitos da exposição ao MnCl ₂ sobre a imunomarcção da TH no GP de ratos 24 h e 30 dias após o tratamento.....	52/53
Figura 12: Efeitos da exposição do MnCl ₂ sobre a imunomarcção do GFAP no estriado de ratos 24 h e 30 dias após o tratamento.....	54
Figura 13: Efeitos da exposição ao MnCl ₂ sobre a imunomarcção do GFAP no GP de ratos 24 h e 30 dias após o tratamento.....	55
Figura 14: Efeitos da exposição ao MnCl ₂ sobre a imunomarcção do GAD no estriado e no GP de ratos 24 h e 30 dias após o tratamento.....	56/57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modelos experimentais encontrados na literatura.....	39
Tabela 2. Efeitos do MnCl ₂ no teste do rotarod em ratos 24 h e 30 dias após tratamento.....	45
Tabela 3. Efeitos do MnCl ₂ no teste do <i>grid</i> em ratos 24 h e 30 dias após tratamento.....	47
Tabela 4. Efeitos do MnCl ₂ nos níveis estriatais de NPSH 24 h e 30 dias após tratamento em ratos.....	48
Tabela 5. Efeitos do MnCl ₂ na atividade do complexo I e II estriatal em 24 h e 30 dias após tratamento em ratos.....	49
Tabela 6. Efeitos do MnCl ₂ na atividade da GR e GPx estriatais em 24 h e 30 dias após tratamento em ratos.....	50
Tabela 7. Efeitos do MnCl ₂ na atividade da SOD estriatal em 24 h e 30 dias após tratamento em ratos.....	51
Tabela 8. Efeitos da exposição do MnCl ₂ sobre a imunomarcagem da GAD 65 no estriado e GP de ratos 24 h e 30 dias após o tratamento.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Adenosina trifosfato
BHE: Barreira hematoencefálica
DA: Dopamina
DAérgico: Dopaminérgico
DP: Doença de Parkinson
DPI: Doença de Parkinson idiopática
DTNB: 5,5'-ditiobis-(2-Ácido Nitrobenzóico)
EROs: Espécies reativas de oxigênio
GABA: Ácido gama-aminobutírico
GABAérgico: Neurônio GABAérgico
GAD 65: Glutamato descarboxilase 65
GFAP: Proteína glial fibrilar ácida
GP: Globo pálido
GPx: Glutathione peroxidase
GR: Glutathione reductase
GSH: Glutathione reduzida
GSSG: Glutathione oxidada
HEPES: Ácido N-2-Hidroxiethylpiperazina-N'-2-Etanosulfônico
I.p.: Intraperitoneal
MDA: Malondialdeído
Mn: Manganês
MnCl₂: Cloreto de manganês
MMT: Tricarbonil metilciclopentadienil de manganês
NaCl: Cloreto de sódio
NADH: *Dinucleotídeo* de nicotinamida e adenina
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo 2'-fosfato reduzido
NPSH: Tióis não-protéicos
PBS: Tampão fosfato salina
PFA: Paraformaldeído
SNC: Sistema nervoso central
SNpc: Substância negra *pars compacta*
SOD: Superóxido dismutase
TBA: Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Tf: Transferrina
TH: Tirosina hidroxilase

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	19
1.1 O MANGANÊS E SUA ATUAÇÃO NO ORGANISMO	19
1.2 EXPOSIÇÃO E TOXICIDADE CEREBRAL DO MN	20
1.3 DOENÇA DE PARKINSON.....	23
1.4 MANGANISMO	24
1.5 DP X MANGANISMO	26
1.6 MODELOS EXPERIMENTAIS COM MN	27
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GERAL:.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 REAGENTES E ANTICORPOS.....	35
4.2 ANIMAIS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	35
4.3 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS	36
4.4 PREPARAÇÃO TECIDUAL PARA ANÁLISES BIOQUÍMICAS	38
4.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO.....	38
4.6 TIÓIS NÃO-PROTÉICOS (NPSH).....	38
4.7 ATIVIDADES DOS COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA	39
4.8 ENZIMAS ANTIOXIDANTES	39
4.9 PREPARAÇÃO DO TECIDO PARA AS ANÁLISES IMUNO- HISTOQUÍMICAS.....	40
4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	41
5. RESULTADOS.....	43
5.1 AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO APÓS TRATAMENTO COM MNCL ₂	43
5.2 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL APÓS O TRATAMENTO COM MNCL ₂	44

5.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS APÓS TRATAMENTO COM $MnCl_2$	47
5.4 ATIVIDADE DOS COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA APÓS TRATAMENTO COM $MnCl_2$	49
5.5 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES APÓS TRATAMENTO COM $MnCl_2$	50
5.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA APÓS TRATAMENTO COM $MnCl_2$	51
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÃO	65
8. REFERÊNCIAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 O MANGANÊS E SUA ATUAÇÃO NO ORGANISMO

O manganês (Mn) foi descoberto no século 18, por Carl Wilhelm Scheele (ANDRUSKA e RACETTE, 2015), e é o décimo segundo elemento mais comum na natureza (CHEN *et al.*, 2015). É um elemento essencial extremamente importante para os sistemas biológicos, sendo requerido no crescimento normal, desenvolvimento e homeostase celular (ASCHNER *et al.*, 2009), (CHTOUROU *et al.*, 2010). De particular importância, no sistema nervoso central (SNC), o Mn atua como cofator de diversas enzimas, dentre elas estão a arginase, piruvato carboxilase (CHEN *et al.*, 2015), superóxido dismutase, glutamina sintetase e outras envolvidas na síntese e metabolismo de neurotransmissores (GOLUB *et al.*, 2005).

No que diz respeito ao seu metabolismo no organismo, sabe-se que apenas em torno de 5% da quantidade ingerida deste metal é absorvida, sendo o restante excretado nas fezes (ROTH, 2009). Andruska e Racette (ANDRUSKA e RACETTE, 2015) relataram que a porção de Mn absorvida, que não é utilizada no metabolismo enzimático, segue uma rota diferente, passando pelo metabolismo de primeira-passagem, tendo então, a bile como destino final.

Segundo Aschner e Aschner (ASCHNER e ASCHNER, 1991), após o consumo, pressupõe-se que o Mn seja absorvido e direcionado à circulação porta (Fig. 1), com estado de oxidação 2^+ . No plasma, o Mn^{2+} se ligaria à $\alpha 2$ -macroglobulina ou albumina. Contudo, ainda no fígado, uma ínfima fração pode ser oxidada pela ceruloplasmina a Mn catiônico trivalente (Mn^{3+}). Nesse estado, ele adentraria na circulação sistêmica, conjugado à transferrina (Tf) plasmática.

Conjugados de Mn-Tf são internalizados pelos neurônios, lugar este que o complexo se dissocia (ASCHNER e ASCHNER, 1991). Os níveis de Mn no SNC são regulados por diversos mecanismos de transporte, dentre os quais destaca-se o sistema de Tf/receptor de Tf (CORDOVA *et al.*, 2012). A neurotoxicidade do Mn está, presumivelmente, relacionada à disponibilidade de Mn^{3+} na circulação sistêmica e a sua taxa de transporte através da barreira hematoencefálica (BHE) (ASCHNER e ASCHNER, 1991).

Em humanos, o Mn atravessa a BHE tanto nos adultos quanto nos fetos e crianças (ASCHNER e ASCHNER, 1991). Quando inalado, o Mn presente nos pulmões é absorvido e então direcionado à circulação sistêmica, esquivando-se do metabolismo de primeira-passagem. Assim,

o Mn é transportado pelo sangue e atravessa, prontamente, a BHE (ANDRUSKA e RACETTE, 2015).

Estruturas encefálicas contêm, normalmente, uma pequena quantidade de Mn. Em altas concentrações, esse metal pode provocar doença cerebral irreversível, com distúrbios psicológicos e neurológicos proeminentes (ASCHNER e ASCHNER, 1991). Portanto, apesar de essencial, a exposição excessiva ao Mn pode causar toxicidade a diversos órgãos/sistemas (ROTH, 2009), incluindo o SNC (RAMA RAO *et al.*, 2007).

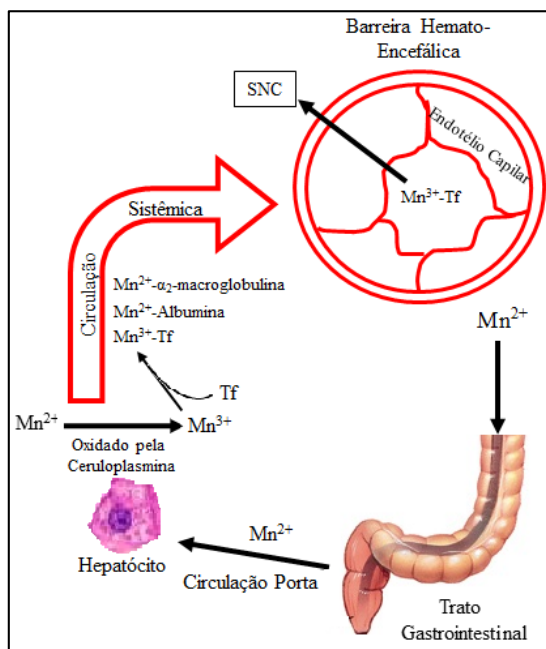


Fig. 1: Transporte do Mn para dentro do cérebro. Metabolismo proposto para o transporte de Mn^{2+} em mamíferos (as setas não estão em escala). Tf: transferrina. Adaptada de Aschner e Aschner (ASCHNER e ASCHNER, 1991).

1.2 EXPOSIÇÃO E TOXICIDADE CEREBRAL DO MN

Os seres humanos são expostos ao Mn pela via alimentar, através do uso de drogas que contêm Mn, como a efedrona (SIKK *et al.*, 2011) e exposição respiratória (MARTINEZ-FINLEY *et al.*, 2013). A absorção pulmonar e o transporte de partículas de Mn através do bulbo olfatório podem levar à deposição de Mn no estriado, além de conduzir a inflamação do epitélio nasal (ROTH, 2009).

Quimicamente, o Mn coexiste nas formas orgânica e inorgânica. Na forma inorgânica, ele é mais comum no ambiente, e é utilizado no branqueamento têxtil, na indústria de ferro, aço, e pilhas (BOUABID *et al.*, 2015). Uma das formas mais importantes de exposição a este metal relaciona-se ao alto contato de mineradores com o mesmo, além de indústrias que produzem baterias, alumínio e soldagem (ASCHNER *et al.*, 2009). Já na forma orgânica, o Mn está presente em fungicidas, a exemplo do Maneb, e em agentes de contraste na ressonância magnética (BOUABID *et al.*, 2015).

No entanto, para o restante da população, o maior contato se dá pela ingestão de água de poço que possua elevados níveis de Mn e, possivelmente, pelo Mn liberado na atmosfera como resultante da adição de tricarbonil metilciclopentadienil de manganês (MMT) à gasolina (ASCHNER *et al.*, 2009).

Ainda, a alimentação parenteral representa uma importante forma de exposição ao Mn, principalmente em recém-nascidos (ERIKSON *et al.*, 2007). Neste contexto, salienta-se que os cérebros de neonatos ou que estão em desenvolvimento são os mais suscetíveis à toxicidade do Mn. Além do mais, a absorção intestinal do metal é maior na primeira semana de vida, decaindo constantemente com a idade. Tais fatores contribuem para um risco maior de neurotoxicidade para recém-nascidos quando expostos ao excesso do metal (MOLINA *et al.*, 2011).

Rama Rao e cols. (RAMA RAO *et al.*, 2007) demonstraram que a exposição excessiva ao Mn pode levar a efeitos prejudiciais ao SNC. A exposição a altos níveis de Mn pode ocasionar disfunção motora extrapiramidal e psiquiátrica severa, similar à encontrada na doença de Parkinson (DP) (HAMAI e BONDY, 2004).

O acúmulo desse metal no cérebro pode gerar sintomas característicos da doença, como irritabilidade, labilidade emocional e alucinações, sendo que estes aparecem meses antes das desordens do movimento (HAMAI e BONDY, 2004), tais como bradicinesia, rigidez (MA *et al.*, 2015), tremor de repouso e instabilidade postural (GUILARTE, 2010). Esses quatro sintomas motores são típicos do parkinsonismo, e estão presentes em até 15% dos trabalhadores expostos ao Mn (RACETTE, 2014). Parkinsonismo, apesar de ser uma expressão clínica, delinea sintomas ligados à disfunção dos gânglios basais (CERSOSIMO e KOLLER, 2006).

O Mn possui afinidade por neuromelanina, pois esta é capaz de interagir com metais pesados (ZECCA *et al.*, 2001). Desse modo, regiões que contêm neuromelanina e são ricas em neurônios dopaminérgicos (DAérgicos), como os gânglios basais e o globo pálido (GP) (LUCCHINI,

MARTIN e DONEY, 2009), acumulam o Mn de forma bastante intensa quando comparadas a outras estruturas.

Alguns estudos indicam que a intoxicação por Mn resulta em perda neuronal e gliose estriatal e no GP (MORELLO *et al.*, 2008). Isso está em conformidade com Eng e cols (ENG, GHIRNIKAR e LEE, 2000) e Peres e cols. (PERES *et al.*, 2015), os quais afirmam que animais expostos ao Mn apresentam um aumento da expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), a qual relaciona-se diretamente com a ativação de astrócitos. Os astrócitos são células que, além de desempenhar inúmeras funções metabólicas e de suporte, ajudam a compor um sistema imune restrito ao SNC (CHIN-CHAN, NAVARRO-YEPES e QUINTANILLA-VEGA, 2015). Esse tipo celular merece destaque nos estudos referentes à exposição ao Mn visto que são alvos precoces da sua toxicidade (EXIL *et al.*, 2014), devido a sua grande capacidade de acumular o metal (GONZALEZ *et al.*, 2008).

Neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos são outros tipos celulares que são dignos de estudos, visto que grande parte da demanda do metabolismo energético no SNC é voltado para a neurotransmissão excitatória e inibitória, respectivamente. Neste contexto, há evidências sugerindo que o prejuízo nos mecanismos dos movimentos com a exposição crônica ao Mn se daria pela alteração astrogliar e no metabolismo neuronal associado aos neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos (BAGGA e PATEL, 2012). De fato, pesquisas retrataram que o sistema GABAérgico estriatal também pode estar envolvido em déficits locomotores após a exposição ao Mn (YANG *et al.*, 2011).

Alguns estudos indicam que, se houver um desajuste nas neurotransmissões glutamatérgicas e/ou GABAérgicas, esse pode ser um importante componente para que se explique a neurotoxicidade do Mn (BURTON *et al.*, 2009). Tal qual afirma Burton e cols (BURTON *et al.*, 2009), a exposição a longo prazo de roedores ao Mn modifica os níveis da glutamato descarboxilase (GAD), principal enzima que medeia a transformação de glutamato em ácido gama-aminobutírico (GABA). Ademais, estudos relataram ter identificado uma elevação substancial de GABA estriatal após a exposição ao Mn em roedores (YANG *et al.*, 2011).

Uma organela alvo da ação do Mn é a mitocôndria. De fato, tanto em neurônios, principalmente DAérgicos, quanto em astrócitos, este metal é rapidamente internalizado nas mitocôndrias, onde pode ligar-se às proteínas da matriz mitocondrial. Deve-se enfatizar que o Mn interage com proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa mitocondrial, causando alterações na síntese de ATP (BAGGA e PATEL, 2012). O Mn

também estimula diretamente a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), afetando, assim, a cadeia transportadora de elétrons (EVREN *et al.*, 2015). Desta forma, o Mn afeta a função mitocondrial através da inibição de transdução de energia e da geração de radicais livres (ZHANG, FU e ZHOU, 2004).

Sabe-se que o estresse oxidativo é consequência do aumento da produção de EROs e, portanto, supõe-se que isso seja a base de toxicidade neuronal induzida por Mn (EXIL *et al.*, 2014). Neste contexto, sugere-se que a neurodegeneração DAérgica decorrente da exposição ao Mn tenha o estresse oxidativo como uma das causas principais (MCMILLAN, 1999; MARTINEZ-FINLEY *et al.*, 2013).

1.3 DOENÇA DE PARKINSON

A DP é a doença neurológica mais comum na vida adulta quando se trata de desordens do movimento (GADOTH, 2002). Tal doença parece possuir diversos fatores desencadeantes, com destaque para os fatores ambientais (MARRAS e GOLDMAN, 2011), sendo a exposição ocupacional a certos metais um fator que parece contribuir para o desenvolvimento da DP idiopática (DPI). Dentre tais metais, o Mn presente na fumaça de indústrias de soldagem representa um risco para os trabalhadores que a aspiram (SRIRAM *et al.*, 2015), aumentando o risco de desenvolvimento da doença.

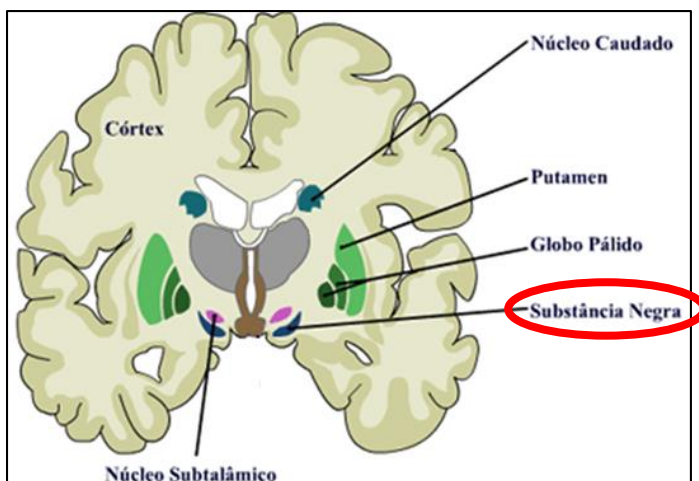


Fig. 2: Região afetada pela DP. A principal área do cérebro afetada pela DP é a SN.

A DP afeta principalmente a área da substância *nigra* (SN) (fig. 2), região essa que possui conexões com o caudado e com o putâmen, e tem o GP como continuidade anatômica. Pode ser dividida em duas partes: a porção compacta, rica em neurônios DAérgicos, e também onde se encontra a neuromelanina; e a porção reticular, que concentra neurônios GABAérgicos. A SN faz conexões com o tálamo, e ambos utilizam o GABA como neurotransmissor principal (NOLTE, 2008).

A DP é assinalada pela perda de neurônios DAérgicos da via nigroestriatal, que é acompanhada por gliose (BATASSINI *et al.*, 2015). A perda DAérgica desencadeia uma cascata de eventos que altera os circuitos nos gânglios basais, gerando a sintomatologia característica da doença. Os principais sintomas são tremores, bradicinesia e distúrbios de marcha (ORDONEZ-LIBRADO *et al.*, 2010). Mas eles não estão restritos apenas à natureza motora, visto que sintomas não-motores também podem ocorrer, a exemplo de disfunções autonômicas (YALCIN *et al.*, 2016). Além disso, segundo Melo, Barbosa e Caramelli, pacientes com DP têm menor facilidade para exercer testes cognitivos, independente da presença de demência (MELO, BARBOSA e CAMELLI, 2007).

O principal tratamento medicamentoso empregado para pacientes com DP é a levodopa (precursora de DA), que demonstra ter efeitos positivos sobre complicações motoras (NAGASHIMA *et al.*, 2016). Quando o tratamento é iniciado precocemente, o paciente com DP pode apresentar uma melhora abrupta nos sintomas. Contudo, conforme a progressão da doença, o processo patológico pode levar à incapacitação funcional mesmo com o tratamento medicamentoso (CARDOSO, 1995).

A DP é a causa mais comum de parkinsonismo (CERSOSIMO e KOLLER, 2006), o que corrobora com Cardoso (CARDOSO, 1995), o qual cita que ela corresponde a cerca de 75% dos casos de síndrome parkinsoniana (parkinsonismo). Esses distúrbios de movimento inerentes à DP são progressivos e irreversíveis, repercutindo danos às estruturas neuronais. Visto isso, sugere-se um vínculo entre a exposição elevada ao Mn ambiental e o aumento do risco de sintomas do tipo parkinsonianos (MILATOVIC *et al.*, 2009). Outra patologia que divide certas semelhanças com a DP é o manganismo.

1.4 MANGANISMO

A exposição ao Mn pode levar a uma síndrome bastante severa neurológica denominada *manganismo* (MICHALKE *et al.*, 2015). Foi descrito pela primeira vez, em 1837, por James Couper. No Brasil, os primeiros relatos ocorreram em 1966, em uma indústria siderúrgica que

produzia aço-liga de Mn, na qual 17 trabalhadores se intoxicaram. O tratamento para intoxicação com Mn é feito por quelação com EDTA, concomitantemente com a levodopa.

Evidências indicam que o manganismo é grave e progressivo e, em grande parte, se assemelha com a DP (O'NEAL *et al.*, 2014). Ele comumente ocorre após exposições ao Mn resultantes, principalmente, da inalação ocupacional exacerbada (ROBISON *et al.*, 2015). Porém, essa condição também pode ocorrer após um grande consumo de água com altos níveis de Mn (HAMAI e BONDY, 2004).

Nessa síndrome, o acúmulo de Mn acontece, preferencialmente, no estriado e no GP (MILATOVIC *et al.*, 2009) (fig. 3). O estriado, que é rico em neurônios DAérgicos e GABAérgicos, representa o principal núcleo de entrada das aferências que chegam aos gânglios da base e é responsável por controlar os movimentos grosseiros do corpo. Já o GP é rico em neurônios GABAérgicos. É dele e da SN que saem as principais eferências que se dirigem ao tálamo, assim, o GP e a SN representam os núcleos de saída das informações que transitam pelos gânglios da base (MA, 1997) (FIX, 2008).

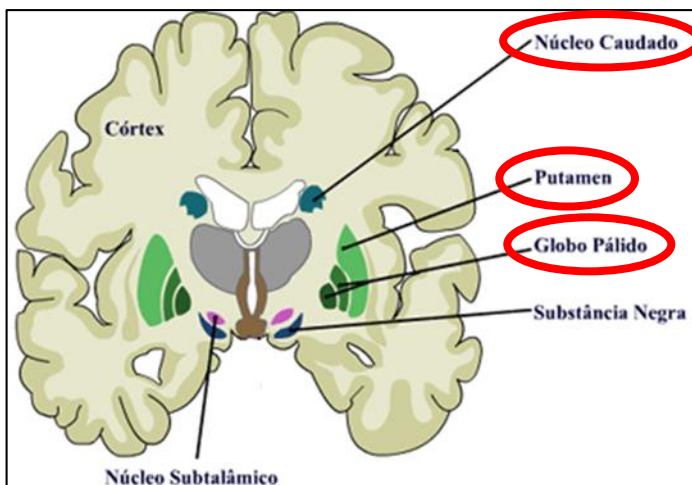


Fig. 3: Regiões afetadas pelos manganismo. As principais áreas do cérebro afetadas pelo manganismo são o estriado (núcleo caudado + putâmen) e o GP.

O manganismo está associado a distúrbios motores e psicológicos, além de ser caracterizada por sintomas do tipo parkinsonianos, mas de forma distinta da DP (BAGGA e PATEL, 2012). Sugere-se assim, um elo comum entre as duas doenças em questão, visto

que os sintomas extrapiramidais associados ao manganismo muitas vezes se sobrepõem com os observados na DP (ROTH e EICHHORN, 2013).

1.5 DP X MANGANISMO

Além do manganismo e da DPI apresentarem alguns sintomas motores semelhantes (por exemplo: distonia, marcha lenta, rigidez e hipocinesia), as exposições crônicas aos altos níveis de Mn também podem causar disfunção psiquiátrica grave (HAMAI e BONDY, 2004). Além disso, a DP e a neurotoxicidade induzida pelo Mn têm em comum os danos mitocondriais e o estresse oxidativo (SIDORYK-WEGRZYNOWICZ e ASCHNER, 2013). O diferencial consiste em que, na DP, a neurodegeneração ocorre anteriormente na SN, enquanto que no manganismo é vista, inicialmente, no GP (WEISS, 2010).

Diferenças entre o manganismo e o parkinsonismo induzido por Mn estão representadas na fig. 4, a qual mostra que o manganismo se deve à intensa exposição aguda (por exemplo, na grandeza de 1 mg/m^3 de partículas inaláveis), ao passo que o parkinsonismo induzido por Mn (e a DPI está incluída aqui) se dá principalmente pelo contato a longo prazo com o Mn, de maneira crônica, mas em pequenas doses (na ordem de 100 ng/m^3 de partículas inaláveis de Mn) (LUCCHINI, MARTIN e DONEY, 2009).

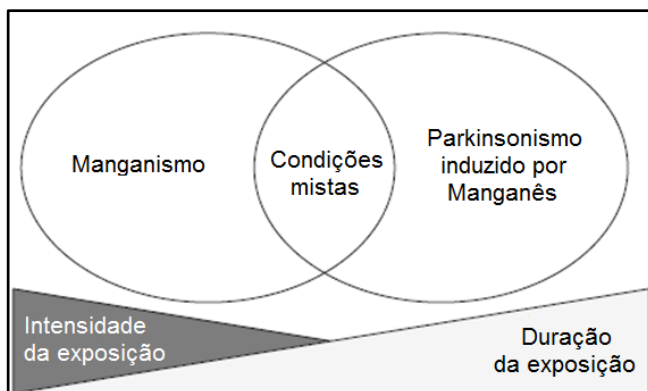


Fig. 4: Diagrama de Venn. Mostra a ocorrência do manganismo, do parkinsonismo induzido por Mn e condições mistas em função da intensidade de exposição e duração da exposição. Adaptado de Lucchini e cols. (LUCCHINI, MARTIN e DONEY, 2009)

Do ponto de vista anátomo-histopatológico, a DP é tipicamente caracterizada por uma perda seletiva de neurônios DAérgicos na substância *nigra pars compacta* (SNpc) e pela presença de corpos de Lewy (SIDORYK-WEGRZYNOWICZ e ASCHNER, 2013), que são inclusões citoplasmáticas eosinofílicas constituídas por estruturas de natureza proteica, características da DP. Por outro lado, o manganismo atinge regiões adicionais do cérebro, como estriado e GP (CHEN *et al.*, 2015), além de não conter corpos de Lewy (SIDORYK-WEGRZYNOWICZ e ASCHNER, 2013). Além disso, conforme previamente mencionado, sabe-se que o Mn tem uma considerável afinidade pela neuromelanina encontrada nos neurônios DAérgicos (DESOLE *et al.*, 1995).

Notavelmente, todas essas estruturas (estriado, GP e SNpc) apresentam quantidades significativas de DA, as quais estão sujeitas à autooxidação, originando espécies reativas hábeis a contribuir para com a degeneração de células DAérgicas (MARTINEZ-FINLEY *et al.*, 2013). Um ponto interessante é o fato de que a denervação de DA corrobora com a formação de radical hidroxil (OH) em cérebros de ratos recém-nascidos (BALASZ *et al.*, 2015), agravando o quadro de degeneração DAérgica.

Segundo Lucchini e cols. as estruturas relacionadas ao manganismo e ao parkinsonismo estão inter-relacionadas com outros componentes dos gânglios basais, tais quais o caudado e putâmen e o núcleo subtalâmico. O influxo de Mn pode ocorrer lentamente a doses muito baixas, mas o seu efluxo é mais vagaroso ainda, o que aumenta a neurotoxicidade do Mn no GP e SNpc (LUCCHINI, MARTIN e DONEY, 2009).

1.6 MODELOS EXPERIMENTAIS COM MN

Inúmeros modelos experimentais de exposição ao Mn têm sido importantes para elucidar mecanismos relacionados à neurotoxicidade induzida por este metal. Neste contexto, Zhang e cols demonstraram que o cloreto de manganês ($MnCl_2$), que é um composto inorgânico utilizado como modelo de toxidade DAérgica, causa redução da atividade dos complexos I, II, III e IV mitocondriais *in vitro*, sendo este efeito concentração-dependente. A inibição da atividade da cadeia respiratória mitocondrial causada pelo Mn foi acompanhada por um aumento considerável da produção EROs (tab. 1) (ZHANG, FU e ZHOU, 2004).

Em um estudo com camundongos, Ordoñez-Librado e cols observaram que a exposição a uma mistura inalatória que continha $MnCl_2$ causou diminuição do número de células TH-imunopositivas no estriado

e alterações motoras, demonstrando ser um modelo muito útil para se estudar eventos neurodegenerativos relacionados à DP (ORDONEZ-LIBRADO *et al.*, 2010).

Outros trabalhos experimentais mostraram que os diferentes tempos e doses utilizados nos estudos podem gerar divergências nos resultados encontrados. Eles relatam que, após exposição subcrônica ao sulfato de Mn, as habilidades atléticas de ratos são significativamente afetadas, ao passo que, após exposição crônica ao Mn, na forma de MMT, as funções neurocomportamentais não mudam significativamente (SU *et al.*, 2015).

O tratamento agudo com $MnCl_2$ em roedores levou a um acúmulo de Mn no cérebro de 200 a 500%, dependendo da região (HAZELL *et al.*, 2006). Em ratos, Huang e cols. relataram haver, além de danos cerebrais, danos hepáticos após a exposição subcrônica ao $MnCl_2$ (HUANG *et al.*, 2011). Já em análises prévias, tem-se achado que a exposição subcrônica ao $MnCl_2$ pode resultar em atenuação da atividade da glutathione peroxidase (GPx) no estriado de ratos (ZHANG, FU e ZHOU, 2004). Enfim, seja aguda ou crônica, a exposição excessiva ao Mn leva a danos irreversíveis do SNC (LAZRISHVILI *et al.*, 2009).

Um estudo com peixes zebra (zebrafish) tratados com Mn demonstrou reversibilidade no que diz respeito à quantidade de TH no telencéfalo (região responsável pelas funções motoras voluntárias) após a descontinuidade da exposição ao Mn. No entanto, dados de modelos animais de mamíferos com reversibilidade ainda são escassos. A maior parte dos estudos envolvendo toxicidade do Mn aponta apenas para danos DAérgicos (BAKTHAVATSALAM *et al.*, 2014). Contudo, nenhum estudo examinou, até hoje, a possibilidade de alteração do sistema GABAérgico após exposição aguda a Mn (YANG *et al.*, 2011).

Com base nos relatos anteriores, nota-se que os estudos para se avaliar a intoxicação por Mn são feitos principalmente em animais. De fato, casos de manganismo para se estudar a neuropatologia a partir de autópsias em humanos são escassos. Ainda, ressalta-se que período exato do início do manganismo é de difícil detecção, e a sua evolução parece ser gradual. Sabe-se que se a exposição ao Mn for contínua, a síndrome tende a piorar, contudo, se o paciente for removido do local de exposição, espera-se que a síndrome seja freada, mas não curada (KOMPOLITI, 2010).

Grupos de pesquisa	Espécie	Modelo e dose	Via de exposição	Tempo de exposição	Alterações comportamentais	Alterações bioquímicas
Zhang e cols	<i>In vitro</i>	MnCl2 (5-1000 µM)	*	2 horas	*	Redução atividade dos complexos I, II, III e IV e da GPx
Ordóñez-Librado e cols	Camundongos	MnCl2 (0,04 M)	Inalatória	1 hora, 2x/semana 5 meses	Acinesia, instabilidade postural e tremor de ação	Redução neurônios TH-immunopositivos
Su e cols	Ratos	MnSO4 (0-20 mg/kg)	Intra-peritoneal	24 semanas	Redução cruzamentos e levantadas	Diminuição da capacidade de aprendizagem da memória espacial
Bakthavatsalam e cols	Peixes zebra	MnCl2 (<2 mM)	Solução no meio de crescimento	48 horas	Movimentos de nado circulares	Redução células TH-immunopositivas e reversão deste efeito após descontinuidade da exposição

Tab. 1. Modelos experimentais encontrados na literatura. Há diversos modelos experimentais que utilizam animais na pesquisa, mas nota-se que não há um padrão para se estudar neurodegeneração.

2. JUSTIFICATIVA

O Mn é um metal essencial para mamíferos. Contudo, inúmeras evidências têm apontado para este elemento como um possível toxicante ambiental/ocupacional ligado à patogenia da DPI, quando os indivíduos são expostos de forma crônica, e ao manganismo, de forma aguda. Embora o GP seja particularmente suscetível aos efeitos tóxicos do Mn e esteja envolvido nas duas patologias (DPI e manganismo), os mecanismos relacionados a tal suscetibilidade são desconhecidos. Além disso, deve-se ressaltar que a DP é considerada a segunda patologia neurodegenerativa mais comum no mundo e que o número de trabalhadores de indústrias com manganismo é bastante elevado.

O SNC é bastante complexo, sendo que diferentes tipos de células e estruturas interagem para a manutenção de suas atividades fisiológicas. Além disso, as substâncias presentes no sangue podem ou não atingir o SNC, dependendo de suas capacidades de atravessar a BHE. Desta forma, a existência de um modelo animal padrão para se estudar os processos patológicos e os tratamentos terapêuticos contra tais processos se mostra de grande importância.

Considerando os aspectos acima mencionados, este projeto teve como objetivo investigar os efeitos da exposição ao $MnCl_2$ na potencial ocorrência de alterações no SNC e sua relação com a neurotoxicidade no estriado e GP em ratos machos Wistar, baseando-se em um modelo experimental de Santos e cols. (SANTOS, D. *et al.*, 2012). Apesar de o manganismo ser irreversível, os estudos após a remoção do paciente a partir do local de exposição são exíguos. Assim, pretendeu-se avaliar também a possível reversibilidade dos efeitos da exposição ao Mn, através da realização de testes comportamentais, bioquímicos e imuno-histoquímica em diferentes momentos (24 h e 30 dias após a exposição ao Mn).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Investigar a possível ocorrência de efeitos neurotóxicos (comportamentais, bioquímicos e histológicos) decorrentes da exposição de ratos Wistar machos ao MnCl_2 , explorando a possibilidade de reversão desta neurotoxicidade após um período de 30 dias de latência (sem exposição).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- (i) Investigar a possível ocorrência de prejuízos comportamentais induzidos pela exposição de ratos ao MnCl_2 , avaliados 24 h após a exposição, através dos testes do campo aberto, rotarod, teste do *beam walking* e *grid*;
- (ii) Investigar a possível ocorrência de alterações bioquímicas induzidas pela exposição de ratos ao MnCl_2 , avaliadas 24 h após a exposição, através da medida da atividade estriatal de complexos (I e II) da cadeia respiratória e de enzimas antioxidantes [glutathione redutase (GR), GPx e SOD], bem como marcadores de estresse oxidativo [reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)] e níveis de tióis não-protéicos (NPSH);
- (iii) Investigar a possível ocorrência de alterações histológicas induzidas pela exposição de ratos ao MnCl_2 , avaliadas 24 h após a exposição, através da medida dos níveis de tirosina hidroxilase (TH), proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e glutamato descarboxilase (GAD) no estriado e no GP;
- (iv) Investigar a possível reversão de efeitos neurotóxicos decorrentes da exposição ao Mn através da medida de parâmetros comportamentais, bioquímicos e histológicos (mencionados nos itens i, ii e iii) após um período de latência de 30 dias (sem exposição).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E ANTICORPOS

Cloreto de Manganês tetra hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 99.99%), 5,5'-ditiobis-(2-Ácido Nitrobenzóico) (DTNB), nicotinamida adenina dinucleotídeo 2'-fosfato reduzido (NADPH), glutatona oxidada (GSSG), GR, GPx, ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e fenol Folin-Ciocalteu foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Anticorpo policlonal rabbit anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP: Dako, Z0334, 1:500, feito em coelho), anticorpo anti-tirosina hidroxilase (TH: US biological, T9237-13, 1:500, feito em cabra), anticorpo policlonal anti-glutamato decarboxilase (GAD) 65 (GAD 65: Chemicon, 1:2000, feito em coelho), anti-rabbit IgG biotilado (Vector, BA-1000), soro de cabra (Gibco, 16210-044), xilol (Synth, X1001.01.BJ) e Entellan (Merck, UN 1866). Todos os outros reagentes foram adquiridos de fornecedores locais.

4.2 ANIMAIS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Ratos Wistar machos (3 meses de idade) foram adquiridos do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), e ciclo de luz 12 h claro/escuro. Eles tinham acesso livre à água e ração. Os experimentos e procedimentos foram realizados de acordo com o comitê de ética para uso de animais da UFSC (CEUA/UFSC PP00765).

Os ratos foram divididos em 2 grupos, 1 grupo controle e 1 grupo tratado com MnCl_2 . Os animais controles receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de salina (NaCl 0,9%) e o grupo de animais tratados receberam MnCl_2 25 mg/kg/dia, quatro vezes, em intervalos de 48 horas. Vinte e quatro horas após a última injeção, os grupos foram submetidos aos testes comportamentais, conforme descritos posteriormente. No dia seguinte, os animais foram eutanasiados e utilizados da seguinte maneira: o grupo de animais tratados com MnCl_2 foi dividido em 2 subgrupos – 1 grupo foi utilizado para os testes bioquímicos e outro grupo de animais para as análises imuno-histoquímicas. O mesmo foi feito com o grupo controle. Além disso, o protocolo experimental foi repetido e as análises comportamentais e bioquímicas foram realizadas 30 dias após a última injeção, avaliando-se os mesmos parâmetros.

O protocolo experimental foi repetido 3 vezes, portanto, a fim de reduzir o viés das diferenças entre os diferentes protocolos, cada resultado foi expresso após ter sido utilizada uma constante distinta, com o intuito de minimizar os erros experimentais.

- 1º experimento: comportamento e imuno-histoquímica antes da latência (15 animais, no total);
- 2º experimento: comportamento, ensaios bioquímicos (complexos mitocondriais, enzimas antioxidantes e parâmetros de estresse oxidativo) antes e após a latência (totalizando 30 ratos)
- 3º experimento: comportamento, ensaios bioquímicos antes da latência (com o intuito de ampliar o n amostral) e imuno-histoquímica após a latência (30 animais foram empregados).

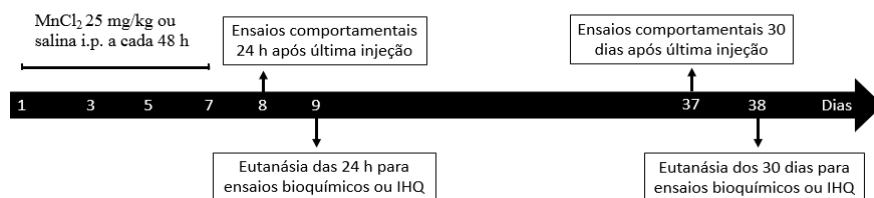


Fig. 5. Linha do tempo experimental.

4.3 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

4.3.1 Campo aberto

A atividade locomotora e exploratória foi avaliada em um aparato de campo aberto, que consistia em bacia circular azul, na qual 8 quadrantes foram desenhados no chão (diâmetro = 44 cm; altura = 22 cm). Cada rato era colocado no centro do campo aberto, e o resultado foi expresso pelo número de quadrantes cruzados pelas quatro patas e pelo número de levantadas sobre as patas traseiras foram registrados (COLLE *et al.*, 2013). Cada animal permanecia no aparato por 6 minutos.

4.3.2 Rotarod

Este teste avalia a integridade do sistema motor. O rotarod consiste em um eixo giratório de 30 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro, que é dividido por discos de 24 cm de diâmetro em 4 compartimentos. Os resultados foram apresentados em segundos, pela

latência da primeira queda do rato, e pelo número total de quedas que foram registradas. O tempo de avaliação (teto) era de 4 minutos (COLLE *et al.*, 2013). A velocidade constante utilizada foi de 7 rpm, como previamente descrito por Mizoguchi e cols (MIZOGUCHI *et al.*, 2002). Antes da administração de $MnCl_2$, os animais receberam uma sessão de treinamento para se aclimatarem com o aparelho (COLLE *et al.*, 2013).

4.3.3 Teste do beam walking

Nesse teste, é avaliado o sistema extrapiramidal, ramo do sistema motor que é incumbido pela coordenação dos movimentos. Avaliou-se o tempo que o animal leva para atravessar a viga de madeira de uma extremidade à outra. O número de resvaladas das patas durante o percurso e o tempo total (em segundos) para atravessar a viga foram registrados. Essa viga possuía 120 cm de comprimento e fora fixada entre duas bancadas, a uma altura de 60 cm do chão. Uma caixa de isopor com maravalha foi colocada na outra extremidade da viga como abrigo, para os animais de alocarem, na qual permaneciam por alguns minutos até a próxima tentativa (SCHALLERT, 2002). Foram dadas três tentativas para cada animal, com intervalo de 1 minuto entre cada uma delas. Os animais receberam uma sessão de treinamento para se acostumarem com o aparato e aprenderem a tarefa antes do tratamento.

4.3.4 Teste do grid

O teste do *grid* avalia rigidez muscular (HAUBER, LUTZ e MUNKLE, 1998). O rato é colocado verticalmente em uma tela com largura de 34 cm, 49 cm de comprimento, 6 cm de altura e espaçamento de 0,4 cm entre cada grade. A inversão da grade ocorreu a uma distância de 30 cm acima de uma caixa contendo maravalha, para que em caso de queda evitasse alguma lesão. É medida a capacidade de sustentação dos animais nesta grade. O tempo para mover as quatro patas é registrada (DHANUSHKODI *et al.*, 2013), até haver a queda do animal. Cada rato teve 10 tentativas, com intervalo de 1 minuto entre cada uma, e ele fora mantido invertido por até 30 segundos, para que fosse possível determinar o maior tempo de permanência. O maior tempo atingido pelo animal foi empregado no cálculo da porcentagem de tempo, registrado como o maior tempo/30 s \times 100 (MOHANASUNDARI *et al.*, 2006).

4.4 PREPARAÇÃO TECIDUAL PARA ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Vinte e quatro horas após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados por decapitação, o cérebro foi removido e o estriado foi dissecado. O estriado de um dos hemisférios foi homogeneizado (1:10 m/v) em tampão HEPES (20 mM, pH 7.0), e então, centrifugado a 16,000 x g a 4 °C por 20 minutos. O sobrenadante obtido foi usado para determinação de atividade enzimática, quantificação dos níveis de NPSH e TBARS. Já o estriado proveniente do hemisfério restante, foi homogeneizado em tampão fosfato (pH 7,4), que continha 0,3 M de sacarose, 5 mM de MOPS, 1 mM de EGTA e 0,1% de albumina. Esses homogenatos foram centrifugados a 1000 x g por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi destinado à determinação da atividade dos complexos I e II da cadeia respiratória mitocondrial. Todos os experimentos bioquímicos foram corrigidos pelos níveis de proteínas, medido pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

4.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi determinado baseado no método descrito por Ohkawa e cols (OHKAWA, OHISHI e YAGI, 1979). Este procedimento avalia a os níveis de peroxidação lipídica. Para dar continuidade, as amostras foram incubadas a 100°C por 60 minutos em meio ácido, contendo sulfato de dodecil sódico a 0,45% e 0,67 % de ácido tiobarbitúrico. Após centrifugação, o produto foi lido, obtendo-se o resultado em nmol de MDA/mg de proteína. Este experimento fundamenta-se em avaliar a formação de malondialdeído (MDA), produto final de peroxidação lipídica, o qual reage com o ácido tiobarbitúrico, originando um composto que pode ser mensurado, em espectrofotômetro, a 532 nm, tendo o MDA como padrão.

4.6 TIÓIS NÃO-PROTÉICOS (NPSH)

Os níveis de NPSH são representados, em quase toda a totalidade, pela GSH, e para isso, foram determinados os seus níveis, utilizando-se de um ensaio colorimétrico reportado por Ellman (ELLMAN, 1959). Para tanto, às amostras, foi acrescentada uma solução de ácido tricloroacético (10%), e foram submetidas à centrifugação de 5000 x g durante 10 minutos a 4

°C. No sobrenadante, até então ácido, foi adicionado uma solução de tampão TFK 1 M para neutralização e o conteúdo de NPSH foi mensurado, espectrofotometricamente, pela redução do DTNB a 412 nm, utilizando-se GSH para uma curva padrão, onde os resultados foram expressos em nmol de NPSH/mg de proteína.

4.7 ATIVIDADES DOS COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA

O método para medir a atividade do complexo I através da redução do ferrocianeto dependente de NADH foi padronizada por Cassina e Radi (CASSINA e RADI, 1996), e inclui algumas alterações realizadas por Latini e cols (LATINI *et al.*, 2005). No que diz respeito à medição da atividade do complexo II, o experimento foi baseado no protocolo determinado por Fischer e cols (FISCHER *et al.*, 1985). A atividade do complexo I foi mensurada através da redução do ferricianeto, espectrofotometricamente, a 420 nm, sendo esta reação, dependente de NADH. No que tange à atividade do complexo II, essa foi investigada através da taxa de absorção do succinato-2,6-diclorofenol indofenol (DCIP) a 600 nm. As atividades de ambos os complexos da cadeia respiratória foram calculadas como nmol/min/ mg proteína.

4.8 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A atividade da GR foi determinada segundo previamente descrito por Carlberg e Mannervik, (CARLBERG e MANNERVIK, 1985), enquanto que a atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi determinada baseando-se em protocolo desenvolvido por Wendel (WENDEL, 1981), o qual preconizava que a enzima GPx catalisa a redução de H₂O₂, utilizando-se da glutathiona reduzida (GSH) como substrato, gerando glutathiona oxidada (GSSG). Esse produto será reduzido pela GR com o consumo de NADPH, que foi medido por intermédio da leitura em espectrofotômetro em 340 nm. A atividade da GPx foi expressa em nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína. A GR encarrega-se de reduzir a GSSG gerada anteriormente a GSH, através do consumo de NADPH. Essa reação é medida indireta e espectrofotometricamente a 340 nm, e sua a atividade foi expressa em nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

O homogenato estriatal também foi usado para determinar a atividade da superóxido dismutase (SOD), seguindo o protocolo de Misra e Fridovich (MISRA e FRIDOVICH, 1972). Através da adição de

amostras de tecidos (0; 2,5; 5; 10 and 20 μ L) contendo SOD, essas amostras inibem a autooxidação da epinefrina. A taxa de inibição foi monitorada por 3 minutos. A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 50% de inibição. Cada amostra possuía 5 pontos a serem lidos, e as absorbâncias iniciais foram subtraídas das finais, resultando em um delta, que foi empregado para se obter uma reta, e através da sua equação, chegar ao valor da atividade em U SOD/mg proteína.

4.9 PREPARAÇÃO DO TECIDO PARA AS ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

Vinte e quatro horas após o fim dos testes comportamentais, os ratos foram eutanasiados por overdose anestésica (hidrato de cloral 40% i.p.) e perfundidos transcardialmente com 300 mL de salina, seguido por 200-250 mL de paraformaldeído (PFA) 4% a 4 °C, diluído em tampão fosfato salina (PBS) 0,1 M (PFA/PBS), pH 7,4. Os animais foram decapitados e o cérebro foi removido, permanecendo em imersão em PFA 4% para fixar por 4 horas. Depois disso, essa solução foi trocada por PBS contendo sacarose a 30% a 4 °C.

Os tecidos foram cortados em fatias com cortes de 20 μ m de espessura (estriado e GP) em um vibrátomo, com solução antifúngica (0,1 M PBS + azida 0,5%) e estocada a 4 °C, até que fossem utilizados. Os cortes foram permeabilizados com tampão de lavagem contendo 3% de Triton X-100 em PBS 0,1M. As peroxidases endógenas foram bloqueadas com H₂O₂ a 0,3% e os sítios não específicos foram bloqueados com soro de cabra 5%, ambos diluídos em tampão de lavagem (coloca os reagentes entre parênteses).

Posteriormente às etapas de lavagem, as fatias foram incubadas com anticorpo primário (diluído em tampão de lavagem com 0,02% timerosal) por aproximadamente 18 h a 4 °C (TH 1:500); GFAP (1:500) e GAD 65 (1:2000). Os anticorpos ligados foram visualizados utilizando-se anticorpo secundário biotilado (1/250; Vectastain), padrão peroxidase-avidina-biotina (1/125; kit Vectastain Elite ABC; Boehringer, Mannheim, Alemanha), e 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich). Todos os tecidos foram analisados por microscopia óptica (Olympus). A densidade óptica (DO) da TH, GFAP e do GAD 65 no estriado e no GP foi mensurada calculando-se a área desenhada à mão livre, no programa ImageJ software (<http://imagej.net/Welcome>).

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As diferenças estatísticas foram avaliadas através da análise do teste t não pareado (*two tailed*), para todos os experimentos. Os dados foram representados com média \pm E.P.M e diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas e os gráficos foram feitos utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO APÓS TRATAMENTO COM $MnCl_2$

5.1.1 Animais tratados com $MnCl_2$ apresentam peso corporal diminuído transcorridas 24 h do final do tratamento

Ratos machos Wistar com 3 meses de idade foram pesados antes do início do tratamento, 24 h após à quarta e última injeção e 30 dias após a finalização do tratamento (Fig. 6). Os grupos foram randomicamente separados antes do tratamento e não apresentaram diferenças significativas em relação aos pesos corpóreos (fig 6A, $p=0,8698$). Vinte e quatro h após o término do tratamento, os animais tratados com $MnCl_2$ tiveram um significativo declínio no peso corpóreo (fig. 6B, $p<0,001$) em relação ao seu grupo controle. Transcorridos 30 dias do tratamento, não se observou diferença significativa entre os grupos (fig. 6C, $p=0,9386$), sugerindo uma recuperação do peso corporal perdido em função do tratamento com Mn. Salienta-se que todos os grupos tiveram livre acesso à água e comida durante todo o período de tratamento e latência.

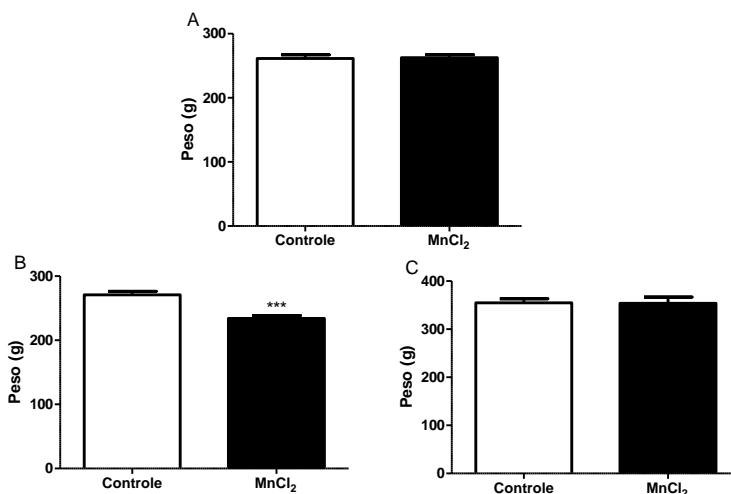


Fig. 6. Efeitos do $MnCl_2$ no peso corpóreo de ratos após 24 h e 30 dias de tratamento. Efeito do $MnCl_2$ sobre o peso corporal dos ratos (A) antes do tratamento ($n=21-24$), (B) 24 h após a última injeção ($n=21-24$) e (C) 30 dias após o término do tratamento ($n=14-16$). Os dados estão apresentados em gramas

(g) e expressos como média \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado teste *t* não pareado; *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle.

5.2 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL APÓS O TRATAMENTO COM $MnCl_2$

5.2.1 Tratamento agudo com $MnCl_2$ reduz o número de cruzamentos e levantadas em ratos 24 h após o tratamento

Com o intuito de examinar a capacidade locomotora dos animais, avaliou-se o número de cruzamentos através do teste do campo aberto (fig. 7A e B). Para investigar a capacidade exploratória, avaliou-se o número de levantadas (fig. 7C e D) com as 2 patas dianteiras. O tratamento com $MnCl_2$ diminuiu significativamente o número de cruzamentos transcorridos 24 h do final do tratamento (fig. 7A, $p = 0,0003$), embora esse efeito não tenha sido observado após o período de latência (fig. 7B, $p = 0,5766$). Além disso, o efeito do tratamento com $MnCl_2$ também causou uma diminuição significativa no número de levantadas transcorridas 24 h da última injeção (fig. 7C, $p = 0,0004$), embora esse efeito não tenha sido observado após o período de latência (fig. 7D, $p = 0,1098$).

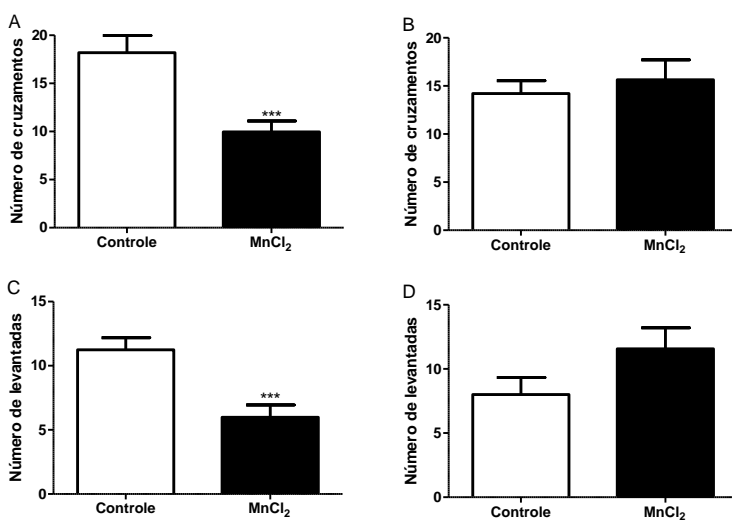


Fig. 7. Efeitos do $MnCl_2$ no número de cruzamentos e de levantadas em ratos 24 h e 30 dias após tratamento. As atividades locomotora (A e B) e exploratória (C e D) foram avaliadas no teste de campo aberto. Os animais foram avaliados

em (A e C) 24 h após a última injeção (n= 21-24) e (B e D) 30 dias após o término do tratamento (n= 14-16). A capacidade locomotora foi quantificada como número de cruzamentos, enquanto que a atividade exploratória foi dada como número total de levantadas. Os dados estão expressos como média \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado o teste *t* não pareado; ****p*<0,001 diferente do grupo controle.

5.2.2 Tratamento agudo de MnCl₂ não causa prejuízo da performance motora em ratos

O teste do rotarod foi realizado para averiguar a performance motora dos animais; foram avaliados o tempo que o rato levou para ter a 1ª queda da barra rotatória, ou seja, a latência da 1ª queda (tab. 2A e C), e o número total de quedas (tab. 2B e D). Em relação ao tempo da 1ª queda, não houve diferenças significativas entre os grupos tanto 24 h após o tratamento (tab. 2A, *p*= 0,4414), quanto após a latência (tab. 2B, *p*= 0,9009). Além disso, em relação ao número de quedas, também não houve diferenças significativas entre os grupos tanto 24 h após o tratamento (tab. 2C, *p*= 0,1095) quanto após a latência (tab. 2D, *p*= 0,2693).

Grupos	Latência da 1ª queda (s)		Número de quedas		
	Após o tratamento	A) 24 h	B) 30 dias	C) 24 h	D) 30 dias
Controle		106,5 ±	66,29 ±	1,422 ±	3,500 ±
		22,45	12,77	0,2543	0,7135
MnCl ₂		84,00 ±	63,64 ±	2,223 ±	5,232 ±
		18,61	16,44	0,3934	1,292

Tab. 2. Efeitos do MnCl₂ no teste do rotarod em ratos 24 h e 30 dias após tratamento. A latência da 1ª queda, expressa em segundos, e o número de quedas no rotarod foram avaliados em (A e C) 24 h após a última injeção (n= 20-24) e (B e D) 30 dias após o término do tratamento (n= 14-16). Os resultados foram expressos como a média \pm EPM.

5.2.3 MnCl_2 aumenta o número de resvaladas em ratos 24 h após tratamento

O *beam walking* é um teste comportamental que avalia a coordenação do sistema motor. Neste estudo, avaliou-se o tempo que o rato levou para atravessar a viga (fig. 8A e B) e o número de resvaladas das patas durante o percurso (fig. 8C e D). O grupo tratado com MnCl_2 não apresentou alterações significativas em relação ao grupo controle no que diz respeito ao tempo de travessia 24 h após a finalização do tratamento (fig. 8A; $p = 0,6054$), nem 30 dias após à latência (fig. 8B; $p = 0,4858$).

Entretanto, no que se refere ao número de resvaladas, houve um aumento significativo deste no grupo MnCl_2 comparado ao grupo controle transcorridas 24 h dos tratamentos (fig. 8C; $p = 0,0135$). Este evento não foi observado após o período de latência (fig. 8D; $p = 0,6558$). Aos animais que apresentaram acinesia durante o percurso e não o completaram, foi atribuído o valor máximo para o percurso, que era de 60 segundos (valor teto).

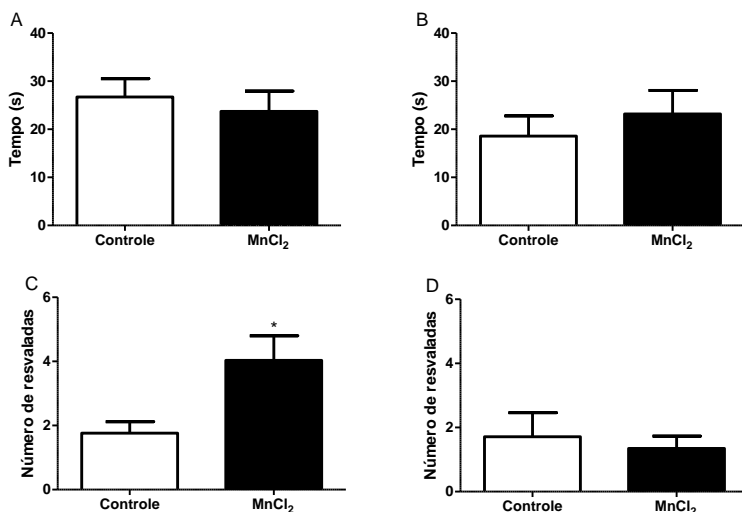


Fig. 8. Efeitos do MnCl_2 no teste do *beam walking* em ratos 24 h e 30 dias após tratamento. O equilíbrio dos animais foi avaliado por meio do teste do *beam walking*. Os animais foram avaliados em (A e C) 24 h após a última injeção ($n = 21-24$) e (B e D) 30 dias após o término do tratamento ($n = 14-16$). O (A e B) tempo para percorrer a viga de uma extremidade à outra, expresso em segundos, assim como (C e D) o número de resvaladas dado pelas patas dos ratos, foram

contabilizados. Os dados estão expressos como a média \pm EPM. Para as análises estatísticas, foi utilizado o teste *t* não pareado; * $p < 0,05$ diferente do grupo controle.

5.2.4 MnCl₂ não danifica o tônus muscular nos ratos

Para finalizar a avaliação comportamental, foi realizado o teste do *grid*, que avalia rigidez muscular. Neste teste, é averiguado se o rato tem a capacidade de aguentar o próprio peso, agarrado a uma grade invertida, através da quantificação do tempo de latência para a queda. Não houve diferenças significativas entre o grupo Mn e o controle nem 24 h depois da última injeção (tab. 3A; $p = 0,5677$), nem após 30 dias de latência (tab. 3B; $p = 0,5806$).

Grupos	Tempo da queda (s)	
	Após o tratamento	
	A) 24 h	B) 30 dias
Controle	22,71 \pm 2,116	17,86 \pm 2,035
MnCl ₂	21,19 \pm 1,657	19,93 \pm 2,967

Tab. 3. Efeitos do MnCl₂ no teste do *grid* em ratos 24 h e 30 dias após tratamento. A rigidez muscular foi avaliada por meio do teste do *grid*. Foi registrado o tempo de sustentação dos ratos, até haver sua queda, com teto de 30 segundos. Os animais foram avaliados em (A) 24 h após a última injeção ($n = 21-24$) e (B) 30 dias após o término do tratamento ($n = 14-16$). Os dados foram calculados segundo a fórmula “maior tempo/30 s \times 100” estão expressos em segundos. Esses resultados são apresentados como a média \pm EPM. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* não pareado.

5.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS APÓS TRATAMENTO COM MNCL₂

5.3.1 MnCl₂ não altera os níveis estriatais de TBARS em ratos

Para verificar se o tratamento com MnCl₂ altera a peroxidação lipídica estriatal, foram mensurados os níveis de TBARS, como mostra a fig. 9. Não houve diferenças significativas entre o grupo MnCl₂ e o

controle em ambos os tempos testados, 24 h (fig. 9A; $p=0,2140$) e 30 dias (fig. 9B; $p=0,1609$) após o tratamento.

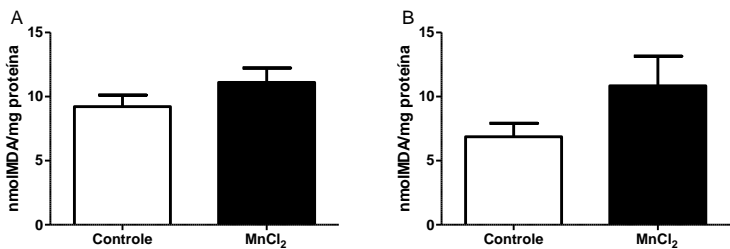


Fig. 9. Efeitos do MnCl₂ nos níveis estriatais de TBARS de ratos 24 h e 30 dias após o tratamento. A peroxidação lipídica estriatal foi verificada pelo método do TBARS em (A) 24 h ($n=14-16$) após a última injeção e (B) 30 dias ($n=7-8$) após o término do tratamento. Os dados estão expressos como a média \pm EPM. A estatística foi realizada utilizando o teste t pareado.

5.3.2 MnCl₂ não altera os níveis estriatais de NPSH em ratos

O tratamento com MnCl₂ não foi capaz de alterar os níveis de NPSH em 24 h após a última injeção (tab. 4A, $p=0,0738$), bem como após 30 dias decorridos do tratamento (tab. 4B, $p=0,3919$).

Grupos	NPSH (nmol SH/mg proteína)	
	A) 24 h	B) 30 dias
Após o tratamento		
Controle	28,26 \pm 1,648	20,40 \pm 1,459
MnCl ₂	32,52 \pm 1,585	22,09 \pm 1,254

Tab. 4. Efeitos do MnCl₂ nos níveis estriatais de NPSH 24 h e 30 dias após tratamento em ratos. Os níveis de tióis não-protéicos foram averiguados em (A) 24 h após a última injeção ($n=14-16$) e (B) 30 dias após o término do tratamento ($n=7-8$). Esses resultados são apresentados como a média \pm EPM. Análises estatísticas foram realizadas utilizando teste t não pareado.

Avaliou-se as atividades das enzimas séricas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (geralmente utilizadas como marcadoras de função hepática), assim como os níveis de ureia e creatinina (geralmente utilizadas como marcadoras de função renal) para ver se o tratamento com MnCl_2 estaria causando efeitos sistêmicos. Não foram observadas diferenças entre os grupos para esses parâmetros (dados não mostrados).

5.4 ATIVIDADE DOS COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA APÓS TRATAMENTO COM MnCl_2

5.4.1 MnCl_2 não altera atividade dos complexos I e II estriatais em ratos.

A tabela 5 apresenta as atividades dos complexos mitocondriais I e II no estriado dos animais. A atividade de ambos os complexos não foi significativamente alterada, tanto em 24 h (tab. 5A; $p=0,6204$) ou 30 dias (tab. 5B; $p=0,7621$) após o tratamento para o complexo I, assim como em 24 h (tab. 5C; $p=0,9709$) ou 30 dias (tab. 5D; $p=0,1068$) após a exposição para o complexo II.

Grupos Após o tratamento	Complexo I (Atividade NADH nmol/min/mg)		Complexo II (nmol/min/ mg proteína)	
	A) 24 h	B) 30 dias	C) 24 h	D) 30 dias
Controle	$84,61 \pm 7,586$	$101,2 \pm 7,480$	$1,976 \pm 0,2128$	$1,876 \pm 0,2544$
MnCl_2	$89,77 \pm 6,968$	$98,37 \pm 5,506$	$1,967 \pm 0,1241$	$2,333 \pm 0,1085$

Tab. 5. Efeitos do MnCl_2 na atividade do complexo I e II estriatal em 24 h e 30 dias após tratamento em ratos. A atividade dos (A e B) complexo I e (C e D) complexo II foi medida em (A e C) 24 h após a última injeção ($n=13-16$) e (B e D) 30 dias após o término do tratamento ($n=7-8$). Os dados estão expressos como a média \pm EPM. Análises estatísticas foram realizadas utilizando teste t não pareado.

5.5 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES APÓS TRATAMENTO COM $MnCl_2$

5.5.1 Atividade da GR e GPx

A atividade de da enzima GR estriatal não foi significativamente alterada tanto em 24 h (tab. 6A; $p=0,3783$) quanto em 30 dias (tab. 6B; $p=0,6954$) após o tratamento. Similarmente, a atividade de da enzima GPx estriatal não foi significativamente alterada tanto em 24 h (tab. 6C; $p=0,1943$) quanto em 30 dias (tab. 6D; $p=0,0593$) após o tratamento.

Grupos Após o tratamento	GR (nmol de NADPH oxidado/min/mg prot)		GPx (nmol de NADPH oxidado/min/mg prot)	
	A) 24 h	B) 30 dias	C) 24 h	D) 30 dias
Controle	$7,884 \pm 0,2642$	$7,503 \pm 0,2448$	$5,889 \pm 0,1935$	$7,934 \pm 0,1976$
$MnCl_2$	$7,177 \pm 0,7012$	$7,324 \pm 0,3573$	$6,312 \pm 0,244$	$9,044 \pm 0,4331$

Tab. 6. Efeitos do $MnCl_2$ na atividade da GR e GPx estriatais em 24 h e 30 dias após tratamento em ratos. A atividade das enzimas antioxidantes (A e B) GR e (C e D) GPx foi medida (A e C) 24 h após a última injeção ($n=14-16$) e (B e D) 30 dias após o término do tratamento ($n=7-8$). Os dados estão expressos como a média \pm EPM. Análises estatísticas foram realizadas utilizando teste t não pareado.

5.5.2 $MnCl_2$ não altera a atividade da SOD em ratos

Dentre os peróxidos existentes no meio celular, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é o principal, e sua decomposição decorre da ação da enzima SOD. A atividade desta enzima foi medida e está explicitada na tabela abaixo. Não houve diferença significativa entre os grupos no que se refere à atividade da SOD, nem 24 h após tratamento (tab. 7A, $p=0,9004$), nem 30 dias (tab. 7B; $p=0,1743$).

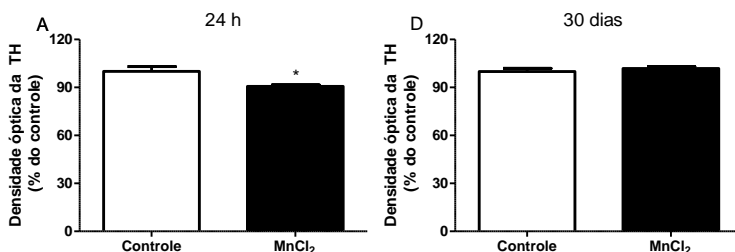
Grupos	SOD (U/mg proteína)	
	A) 24 h	B) 30 dias
Controle	11,58 ± 0,7137	14,32 ± 0,8986
MnCl₂	11,71 ± 0,7198	13,01 ± 0,3240

Tab. 7. Efeitos do MnCl₂ na atividade da SOD estriatal em 24 h e 30 dias após tratamento em ratos. A atividade da enzima antioxidante SOD foi investigada em (A) 24 h após a última injeção (n= 7-8) e (B) 30 dias após o término do tratamento (n= 7-8). Os dados estão expressos como a média ± EPM. Análises estatísticas foram realizadas utilizando teste *t* não pareado.

5.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA APÓS TRATAMENTO COM MNCL₂

5.6.1 MnCl₂ reduz os níveis estriatais de TH 24 h após tratamento

O tratamento com MnCl₂ reduziu a imunorreatividade da TH no estriado 24 h após o término do tratamento em comparação com o grupo controle (fig. 10A, $p=0,0148$), embora este efeito não tenha sido observado transcorridos 30 dias da última injeção (fig. 10D, $p=0,4419$). Por outro lado, no GP não houve diferença significativa entre os grupos em ambos os tempos testados: 24 h (fig. 11A, $p=0,2260$) e 30 dias (fig. 11D, $p=0,1126$).



(Continuação da figura e legenda na próxima página)

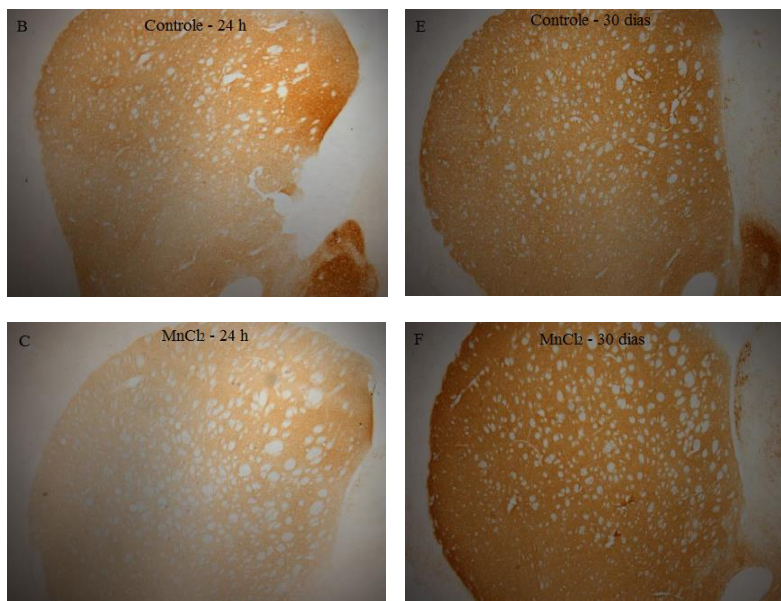
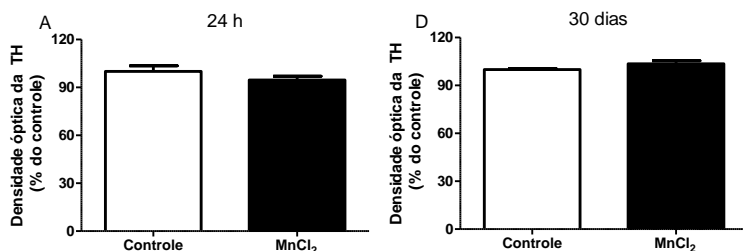


Fig. 10. Efeitos da exposição do MnCl_2 sobre a imunomarcaco da TH no estriado de ratos 24 h e 30 dias após o tratamento. Quantificação relativa da densidade ptica (DO) para TH no estriado (A) 24 h após a última administração de MnCl_2 (n= 6-7) e (B) 30 dias após o término do tratamento (n= 7-8). Imagens representativas da imunquantificao dos grupos (B) controle 24 h, (C) MnCl_2 24 h, (E) controle 30 dias e (F) MnCl_2 30 dias. Os dados estão expressos como a média \pm EPM da porcentagem do controle. Análises estatísticas foram realizadas utilizando teste *t* não pareado. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.



(Continuação da figura e legenda na próxima página)

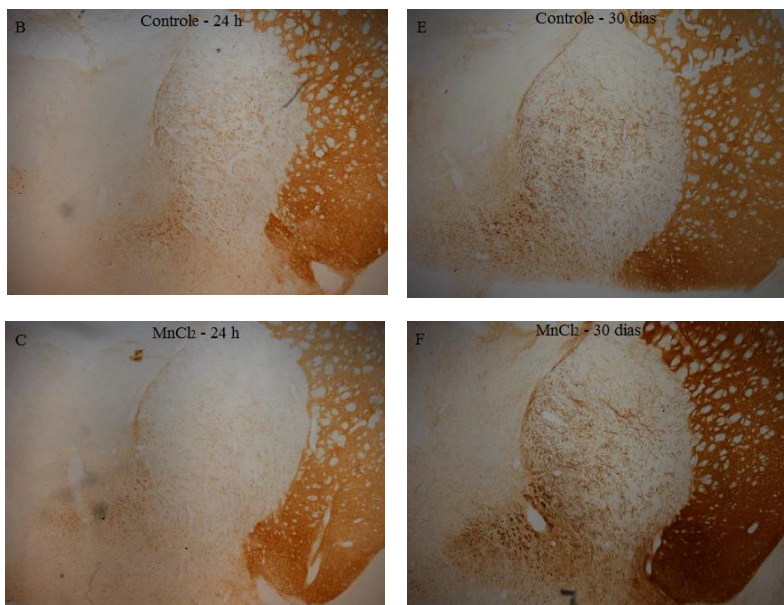


Fig. 11. Efeitos da exposição ao MnCl_2 sobre a imunomarcção da TH no GP de ratos 24 h e 30 dias após o tratamento. Quantificação relativa da DO para TH no GP. (A) 24 h após a última administração de MnCl_2 ($n=6-7$) e (B) 30 dias após o término do tratamento ($n=7-8$). Imagens representativas da imunoquantificação dos grupos (B) controle 24 h, (C) MnCl_2 24 h, (E) controle 30 dias e (F) MnCl_2 30 dias. Os dados estão expressos como a média \pm EPM da porcentagem do controle. Análises estatísticas foram realizadas utilizando teste t não pareado.

5.6.2 MnCl_2 aumenta os níveis de GFAP no GP 30 dias após tratamento

No estriado, a imunorreatividade de GFAP não se mostrou significativamente diferente entre os grupos em 24 h (fig. 12A, $p=0,4976$) ou 30 dias (fig. 12D, $p=0,8821$) após o tratamento. Entretanto, no GP, a imunorreatividade de GFAP foi significativamente maior no grupo de animais tratados com MnCl_2 em relação ao grupo controle, 30 dias após o término da exposição (fig. 13B, $p=0,0282$), embora não tenha se alterado 24 h após o tratamento (fig. 13D, $p=0,1818$).

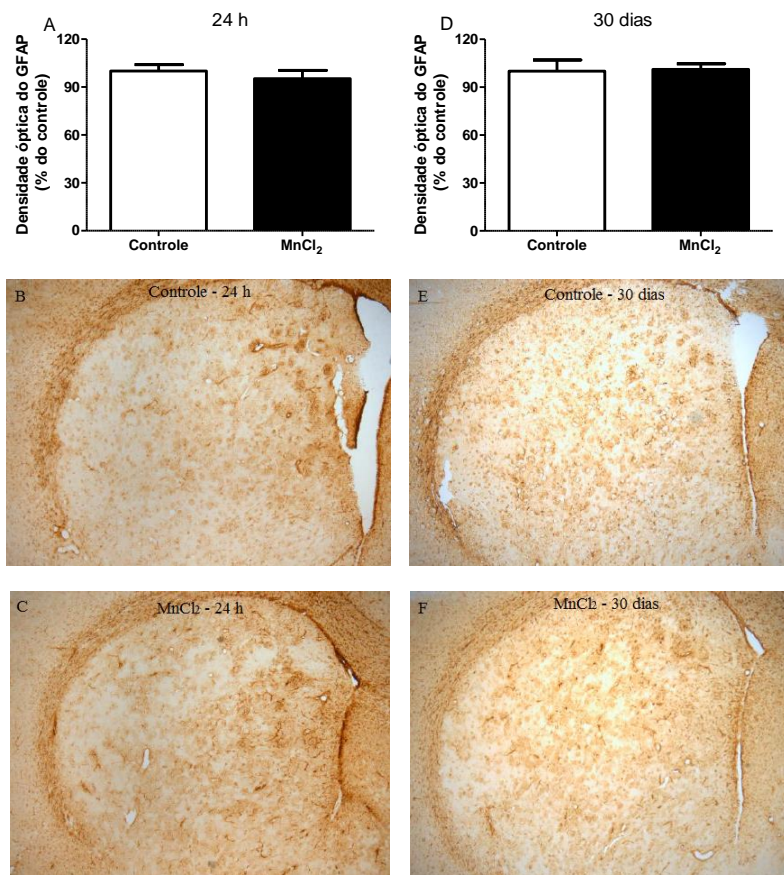


Fig. 12. Efeitos da exposição do MnCl₂ sobre a imunomarcção do GFAP no estriado de ratos 24 h e 30 dias após o tratamento. Quantificação relativa da DO para GFAP no estriado (A) 24 h após a última administração de MnCl₂ (n= 6-7) e (B) 30 dias após o término do tratamento (n= 7-8). Imagens representativas da imunoquantificação dos grupos (B) controle 24 h, (C) MnCl₂ 24 h, (E) controle 30 dias e (F) MnCl₂ 30 dias. Os dados estão expressos como a média \pm EPM da porcentagem do controle. Análises estatísticas foram realizadas utilizando teste *t* não pareado.

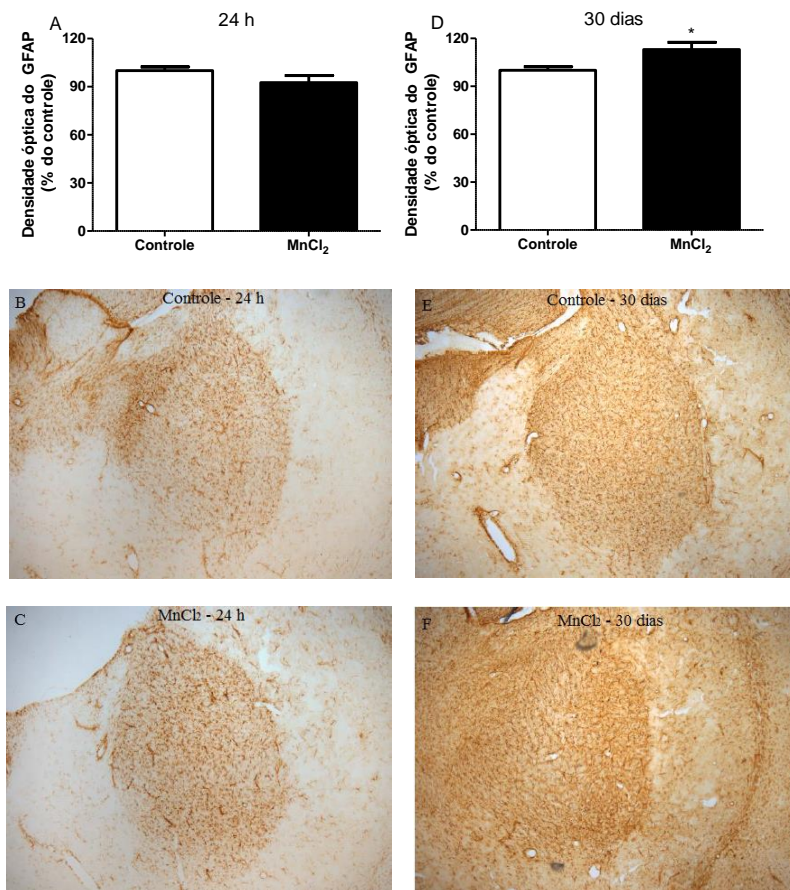


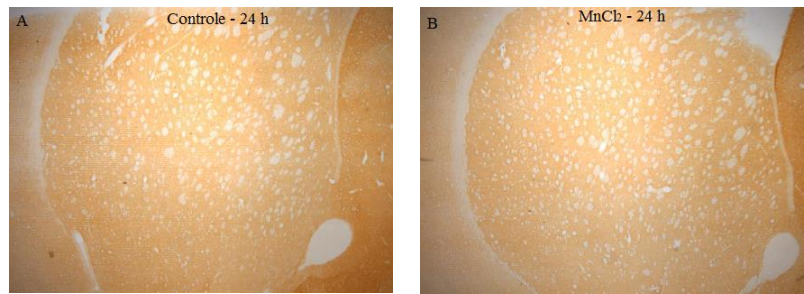
Fig. 13. Efeitos da exposição ao MnCl₂ sobre a imunomarcção do GFAP no GP de ratos 24 h e 30 dias após o tratamento. Quantificação relativa da densidade óptica (DO) para GFAP no GP. (A) 24 h após a última administração de MnCl₂ (n= 6-7) e (B) 30 dias após o término do tratamento (n= 7-8). Imagens representativas da imunoquantificação dos grupos (B) controle 24 h, (C) MnCl₂ 24 h, (E) controle 30 dias e (F) MnCl₂ 30 dias. Os dados estão expressos como a média \pm EPM da porcentagem do Ct. Análises estatísticas foram realizadas utilizando teste *t* não pareado. **p*<0,05 diferente do grupo controle.

5.6.3 MnCl₂ não altera os níveis de GAD 65 em ratos

A exposição ao MnCl₂ do grupo tratado não alterou a imunorreatividade de GAD 65, comparado com o controle, no estriado 24 h (tab. 8A p= 0,3584) e 30 dias após o tratamento (tab. 8B, p= 0,0733). Similarmente, não houve diferenças significativas no GP 24 h (tab. 8C, p= 0,4267) e 30 dias após o término da exposição (tab. 8D, p= 0,5423).

Grupos Após o tratamento	Densidade óptica Estriado (% do controle)		Densidade óptica GP (% do controle)	
	A) 24 h	B) 30 dias	C) 24 h	D) 30 dias
Controle	100,0 ± 4,792	100,0 ± 6,947	100,0 ± 7,307	100,0 ± 14,26
MnCl ₂	94,08 ± 3,979	124,5 ± 10,04	106,3 ± 3,408	88,44 ± 11,97

Tab. 8. Efeitos da exposição do MnCl₂ sobre a imunomarcagem da GAD 65 no estriado e GP de ratos 24 h e 30 dias após o tratamento. (A e C) 24 h após a última administração de MnCl₂ (n= 6-7) e (B e D) 30 dias após o término do tratamento (n= 7-8). Quantificação relativa da DO para GAD 65 no estriado (A e B) e GP (C e D). Os dados estão expressos como a média ± EPM da porcentagem do controle. Análises estatísticas foram realizadas utilizando teste *t* não pareado



(Continuação da figura e legenda na próxima página)

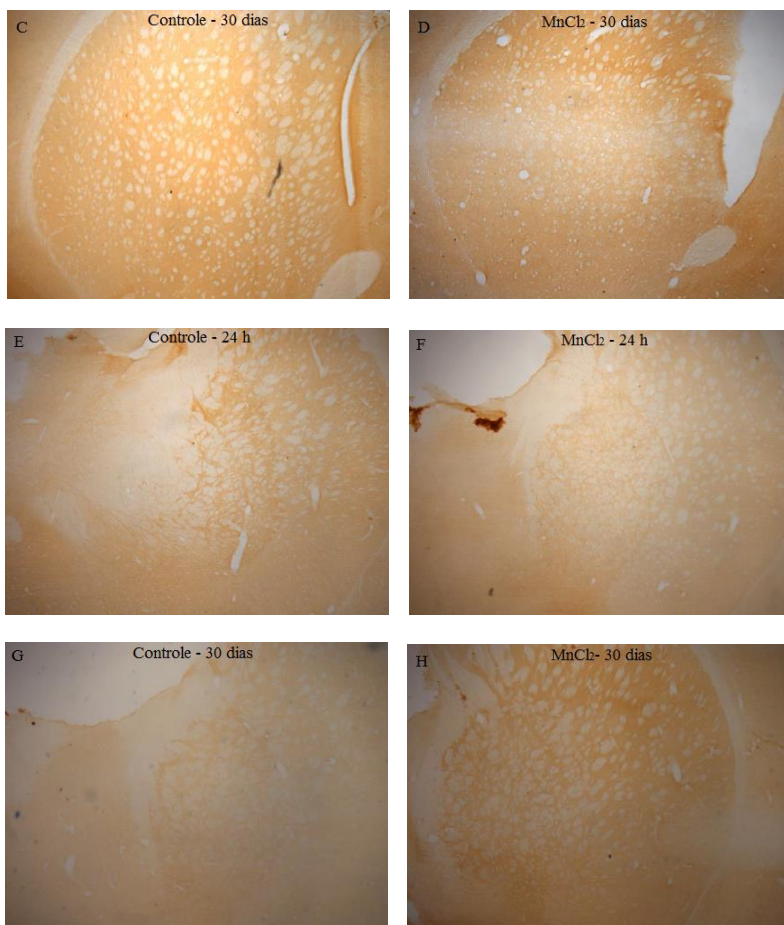


Fig. 14. Efeitos da exposição ao MnCl_2 sobre a imunomarcação do GAD no estriado e no GP de ratos 24 h e 30 dias após o tratamento. Imagens representativas da imunoquantificação do estriado dos grupos (A) controle 24 h, (B) MnCl_2 24 h, (C) controle 30 dias e (D) MnCl_2 30 dias; e do GP, dos grupos (E) controle 24 h, (F) MnCl_2 24 h, (G) controle 30 dias e (H) MnCl_2 30 dias.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram avaliados os efeitos da exposição ao MnCl_2 em ratos, o qual já havia sido previamente utilizado como um modelo de toxicidade DAérgica (ZHANG, FU e ZHOU, 2004). Utilizou-se ratos Wistar baseado no modelo experimental proposto por Santos e cols (SANTOS, D. *et al.*, 2012), para se estudar os mecanismos de toxicidade induzidos pelo MnCl_2 .

A intoxicação aguda alterou o peso corporal (fig. 4) do grupo de animais tratados com MnCl_2 24 h após o término do tratamento em relação ao grupo controle. Para os animais analisados nos 30 dias posteriores à exposição, os ratos tratados com MnCl_2 tiveram seus pesos recuperados e normalizados aos níveis do grupo controle. Assim, pode-se sugerir que a exposição ao MnCl_2 exerceu uma toxicidade aguda nos animais, tendo em vista que após 30 dias do final do tratamento o peso dos animais retornou aos níveis normais (semelhantes ao grupo controle), reforçando os dados já demonstrados anteriormente (SANTOS, D. *et al.*, 2012).

O efeito da exposição ao MnCl_2 sobre fatores comportamentais foi examinado com o propósito de avaliar o equilíbrio, coordenação e locomoção dos animais. Para tal, realizou-se o teste do rotarod, *grid* (DHANUSHKODI *et al.*, 2013) e *beam walking* (SCHALLERT, 2002), além do teste do campo aberto, o qual avalia, além da atividade locomotora espontânea, a capacidade exploratória do animal (SANTOS, D. B. *et al.*, 2012). Corroborando com estudos de Santos e cols (SANTOS, D. *et al.*, 2012), após às 4 administrações do MnCl_2 , o número de cruzamentos e o número de levantadas no campo aberto (fig. 5) diminuiu expressivamente após às 24 h de exposição à última dose. Contudo, para avaliar se o efeito da intoxicação do MnCl_2 permaneceria nos animais por um maior período, avaliou-se os mesmos parâmetros 30 dias após o final do tratamento. Observou-se que os números de cruzamentos e levantadas do grupo MnCl_2 se normalizou aos valores do grupo controle, mostrando assim que estes efeitos da toxicidade do MnCl_2 são reversíveis, quando a exposição ocorre de maneira aguda, nesse protocolo experimental.

Para se analisar as habilidades de coordenação motora dos ratos, foi empregado o teste do rotarod (MOHANASUNDARI *et al.*, 2006). Não houve diferença significativa no número total de quedas, nem na latência da 1ª queda dos animais tratados com MnCl_2 em relação ao controle (tab. 1), diferente dos registros de Ávila e cols (AVILA *et al.*, 2010), que registraram aumento no número de quedas e diminuição na latência da 1ª

quedas. Contudo, essa discordância pode ser explicada pelo fato de tal estudo ter sido realizado por um período de exposição crônica de 4 meses com $MnCl_2$ na água de beber dos ratos, e a exposição aguda, aqui empregada, talvez não tenha sido o suficiente para causar todos os danos motores característicos vistos em pacientes com manganismo.

O *beam walking* é um teste que abarca tanto o tempo de travessia de uma viga, quanto as resvaladas dadas pelas patas dos animais (SCHALLERT, 2002). Não houve discrepância entre os grupos $MnCl_2$ e controle no tempo de travessia. Contudo, o número de resvaladas 24 h após o tratamento aumentou no grupo $MnCl_2$ comparado ao controle, tendo esse aumento sido normalizado aos níveis do controle após 30 dias de tratamento (fig. 6). Tal aumento pode estar relacionado a danos no sistema motor extrapiramidal, como relatado por Hamai e Bondy (HAMAI e BONDY, 2004). Isso pode ocorrer após a exposição a altos níveis do metal. Dado que aqui foi utilizado o modelo agudo de exposição, talvez isso explique a normalização do número de resvaladas do grupo Mn aos níveis do controle, pois pode ser que o sistema motor extrapiramidal não tenha sido tão afetado quanto nas exposições crônicas ao metal. De qualquer forma, apenas uma análise histológica e/ou bioquímica neste sistema específico poderia comprovar esta hipótese.

Além disso, também foi verificada a capacidade sensorimotora do animal através do teste do *grid* (ZHANG *et al.*, 2009). Também não houve alterações no tempo de queda entre o grupo $MnCl_2$ e controle, seja 24 h ou 30 dias após a exposição (tab. 2). Alguns dados comportamentais, aparentemente divergentes encontrados neste trabalho quando comparados a demais dados da literatura, poderiam ser explicados pela diferente via de exposição ao $MnCl_2$, visto que, em termos ocupacionais, o principal contato é inalatório e, aqui, foi utilizada a via i.p. Para Su e cols, (SU *et al.*, 2015), que utilizou outra linhagem de ratos em seus estudos, com exposição i.p. a diferentes concentrações de Mn sob a forma de sulfato por 24 semanas, a mudança na via de exposição e as diferentes doses relatadas na literatura podem gerar, ou não, mudanças na atividade locomotora do animal após a exposição ao Mn.

Na análise da peroxidação lipídica (fig. 7), não houve alteração no nível estriatal de TBARS no grupo $MnCl_2$ comparado com o controle às 24 h após o término do tratamento. Aos 30 dias depois de ter cessado a exposição, embora tenha aumentado visivelmente o nível estriatal de TBARS no grupo tratado com $MnCl_2$, também não houve mudanças significativas. Diferentemente dos resultados deste protocolo, outros trabalhos mostraram que a exposição ao $MnCl_2$ eleva os níveis de TBARS (CHTOUROU *et al.*, 2010) (GABRIEL *et al.*, 2013). Ainda, em relação

aos níveis de NPSH (tab. 3), também não houve alteração significativa entre os grupos, independentemente do período avaliado (24 h ou 30 dias após o tratamento). Nossos resultados divergem daqueles de Chtoutou e cols (CHTOUROU *et al.*, 2010), que mostraram uma redução nos níveis de NPSH após a exposição ao $MnCl_2$. Contudo, essas divergências do TBARS e NPSH podem ser explicadas pela diferente dose utilizada, modelo animal escolhido e pela via de exposição distinta, visto que o grupo de Gabriel e cols dissolveram 3,88 mg/L $MnCl_2$ na água do aquário por 96 h, ao passo que Chtourou e colegas aplicaram, por via oral, solução de 20 mg/mL $MnCl_2$ em ratos por 30 dias. Dessa forma, nota-se que, embora seja sabido que o Mn pode levar ao estresse oxidativo no SNC (RAMA RAO *et al.*, 2007), a ocorrência efetiva deste fenômeno em diferentes estruturas encefálicas depende de muitas variáveis, tais como tempo de exposição, dose, via de administração, etc.

Algumas evidências sugerem que o excesso de Mn pode lesar diversos órgãos (ROTH, 2009). Com base nisso, resolveu-se investigar se o modelo experimental utilizado neste estudo seria capaz de causar danos periféricos. Não foram observadas diferenças entre os grupos para as atividades séricas das enzimas AST e ALT (marcadoras de função hepática), nem nos níveis séricos de ureia ou creatinina (marcadores de função renal).

Conforme dados literários, o $MnCl_2$ é capaz de reduzir a atividade dos complexos I e II da cadeia respiratória mitocondrial de ratos, de maneira dose-dependente, como mostraram Zhang e cols (ZHANG, FU e ZHOU, 2004). Por outro lado, Cordova e cols (CORDOVA *et al.*, 2012) relataram que o tratamento com $MnCl_2$ com diferentes doses, também em ratos, pode aumentar a atividade do complexo I, enquanto que no complexo II, os dados parecem contraditórios, visto que, dependendo da dose, pode ocorrer aumento ou diminuição. Diferentemente, neste trabalho utilizou-se um modelo de exposição aguda ao $MnCl_2$, o qual não foi capaz de causar alterações significativas nas atividades dos complexos I e II no estriado dos animais.

No que se refere à atividade de enzimas antioxidantes, a atividade da GR estriatal mostrou-se inalterada em 24 h ou 30 dias após à exposição ao $MnCl_2$, confirmando os registros feitos por Balasz e cols (BALASZ *et al.*, 2015). Já em relação à atividade da GPx estriatal, apesar de o tratamento com Mn não ter resultado em mudança significativa, a literatura se mostra controversa, visto que Chtourou e cols (CHTOUROU *et al.*, 2010) registraram redução na sua atividade, enquanto que Balasz e colegas (BALASZ *et al.*, 2015) indicaram haver um aumento da GPx. Em modelos *in vitro*, a literatura diz que a exposição do $MnCl_2$ reduz a

atividade ambas enzimas, GR e GPx, como no estudo de Maddirala e colegas (MADDIRALA, TOBWALA e ERCAL, 2015).

A atividade da SOD estriatal também permaneceu inalterada depois do tratamento com $MnCl_2$, o que corrobora com o trabalho de Balasz e cols (BALASZ *et al.*, 2015). No entanto, Gabriel e cols relataram que há aumento na atividade da SOD após exposição ao $MnCl_2$ (GABRIEL *et al.*, 2013), enquanto que Chtourou e cols relataram que ela reduz (CHTOUROU *et al.*, 2010). O que esclarece tais divergências são os protocolos empregados. Gabriel e cols utilizou peixes em seu estudo e, além disso, dissolveram o $MnCl_2$ por 4 dias no próprio aquário dos animais. Por outro lado, Chtourou e colegas, administraram $MnCl_2$ 20mg/kg em ratos durante 30 dias. Dessa forma, embora seja sabido que o Mn pode levar a alterações nas atividades das enzimas antioxidantes estudadas, a ocorrência efetiva deste fenômeno em diferentes estruturas encefálicas também depende de muitas variáveis, tais como tempo de exposição, dose, via de administração, etc.

As disparidades poderiam ser explicadas pelo fato de que não houve aumento na produção de EROs a ponto de afetar a atividade destas enzimas. Além disso, o protocolo de Balasz e cols. difere dos outros dois protocolos descritos anteriormente, pois utilizaram ratas prenhas que foram expostas ao $MnCl_2$ pela água de beber contendo 10.000 ppm do metal; sendo assim, todas essas distinções juntas podem ter contribuído para que a literatura divirja.

Baseando-se no fato de o Mn causar toxicidade em neurônios DAérgicos, decidiu-se verificar o efeito da exposição aguda ao $MnCl_2$ sobre a expressão da enzima TH (marcador de neurônios catecolaminérgicos) no estriado e GP dos animais. No estriado, sua imunorreatividade sofreu uma redução significativa no grupo Mn após 24 h do tratamento, sendo recuperada e normalizada àquela do grupo controle 30 dias depois da exposição. A diminuição da imunorreatividade da TH no estriado após a exposição ao Mn pode estar relacionada a mudanças nas vias de síntese de neurotransmissores catecolaminérgicos, particularmente, a DA (MENON, CHANG e KIM, 2016). No GP não houve diferença na sua imunomarcção, em quaisquer um dos tempos analisados.

Referente aos astrócitos, por fazerem parte do sistema de defesa do SNC (CHIN-CHAN, NAVARRO-YEPES e QUINTANILLA-VEGA, 2015), podem ser ativados frente a toxicantes. O $MnCl_2$ não alterou a imunomarcção de GFAP no estriado dos animais, independentemente do tempo avaliado (24 h ou 30 dias após a exposição), sugerindo ausência de gliose reativa. No GP, nas 24 h que se seguiram, não houve diferença,

contudo, foi possível observar uma maior imunorreatividade ao GFAP nos animais tratados com $MnCl_2$ após 30 dias de latência. Essa ativação pode ser explicada pelo fato de que os astrócitos também possuem afinidade pelo Mn, podendo acumulá-lo. A gliose reativa (aumento da reatividade da GFAP) observada no GP aos 30 dias após a exposição sugere a existência de um processo reativo/inflamatório tardio, o qual poderia ser responsável por eventos neurodegenerativos tardios decorrentes da exposição ao Mn.

Como já mencionado, um dos mecanismos de toxicidade do Mn se dá, possivelmente, pela alteração metabólica associada a neurônios GABAérgicos (BAGGA e PATEL, 2012), com destaque para o GP, no qual esse tipo de neurônio é o alvo direto da toxicidade do metal (LUCCHINI, MARTIN e DONEY, 2009). No estriado, bem como no GP, não foram evidenciadas alterações na imunorreatividade da enzima glutamato descarboxilase (GAD 65, marcador de neurônio GABAérgico) posteriormente à exposição ao Mn. Estes dados corroboram com Burton e cols (BURTON *et al.*, 2009), que em estudos com primatas não-humanos expostos ao Mn também não observaram alterações nos níveis teciduais de GABA no caudado/putâmen (estriado) e no GP.

No presente trabalho, foi apresentado um modelo experimental para que se pudesse estudar os mecanismos que levam à toxicidade aguda do $MnCl_2$. Neste contexto, investigou-se a possível reversibilidade dos efeitos provocados pela sua exposição ao Mn em ratos. Os danos motores reversíveis observados no campo aberto e no *beam walking* podem ser indicadores de que, após a exposição ao Mn ser descontinuada, os efeitos/sintomas da intoxicação pelo Mn podem ser atenuados, embora não se possa dizer que os animais foram *curados* da intoxicação.

O aumento da expressão de GFAP no globo pálido somente após decorridos 30 dias do tratamento com $MnCl_2$ poderia ser explicado pela vagarosa entrada de Mn no cérebro, em concentrações muito baixas, e o seu efluxo ser mais lento ainda, o que aumenta a neurotoxicidade do Mn no GP depois da exposição (LUCCHINI, MARTIN e DONEY, 2009). À exceção do GFAP, esse modelo experimental mostrou que praticamente todos os parâmetros analisados ou voltaram ao normal, depois do contato com Mn ser descontinuado, ou não se alteraram, no caso dos complexos, marcadores de estresse oxidativo e enzimas antioxidantes, no caso de exposição aguda.

Em peixes zebra (*zebrafish*) expostos a soluções de $MnCl_2$ (doses menores que 2 mM), as larvas apresentaram defeitos locomotores (demonstrados pelos movimentos circulares que elas exibiam) e posturais, além de redução da imunorreatividade da TH no telencéfalo,

fatores esses que se mostraram reversíveis após 48 h de exposição (BAKTHAVATSALAM *et al.*, 2014). Contudo, este modelo não parece ser suficiente para se estudar os efeitos causados por uma intoxicação aguda.

No presente trabalho, demonstrou-se que o modelo experimental utilizado induziu em ratos Wistar danos encontrados em indivíduos humanos expostos agudamente ao $MnCl_2$. Embora considera-se os resultados deste estudo relevantes, acredita-se que futuros estudos devam focar, adicionalmente, nos mecanismos de captação e distribuição do Mn no cérebro a fim de se ter um panorama mais completo da sua toxicidade. Enfatiza-se que é importante que se tenha um modelo experimental para se estudar síndromes como o manganismo em mamíferos, pois além de serem casos cada vez mais recorrentes, a padronização de um modelo contribuirá para reduzir as divergências encontradas na literatura sobre o a exposição ao Mn.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram analisados parâmetros comportamentais, bioquímicos e imuno-histoquímicos. O tratamento com $MnCl_2$, como já descrito na literatura, mostrou-se ser um bom modelo para se estudar toxicidade DAérgica em ratos. Dessa maneira, concluiu-se que:

- (i) Houve uma diminuição significativa no peso corporal dos ratos expostos ao $MnCl_2$ após 24 em comparação ao grupo controle. O peso corporal foi recuperado e normalizado após à latência de 30 dias. Os prejuízos motores que se mostraram alterados pela exposição aguda ao $MnCl_2$ foram a redução do número de cruzamentos e levantadas no campo aberto, e o aumento do número de resvaladas no *beam walking* nas 24 h que se seguiram do tratamento. Contudo, esses números foram normalizados ao grupo controle, passados 30 dias à última dose da exposição;
- (ii) A exposição aguda ao metal não afetou os parâmetros bioquímicos analisados. Sabendo que o Mn pode causar alterações nos parâmetros avaliados em outros modelos experimentais, é possível que a ausência de resultados significativos esteja relacionada às particularidades do protocolo experimental (dose, tempo de exposição, linhagem animal utilizada);
- (iii) A imunorreatividade da TH foi reduzida 24 h após à exposição ao $MnCl_2$ no estriado; contudo, depois de 30 dias, foi revertida comparada à do grupo controle. A imunomarcção do GFAP se alterou apenas ulteriormente à latência, não sendo afetado nas 24 h após o tratamento pela exposição aguda. A exposição aguda também não afetou a imunorreatividade da GAD 65 em nenhum dos tempos analisados.

Notavelmente, verificou-se a potencial reversibilidade de sintomas decorrentes da intoxicação do $MnCl_2$ após 30 dias da exposição, o que torna esse modelo experimental de intoxicação aguda um bom protótipo de fácil reprodução para futuros estudos sobre manganismo e síndrome com sintomas parkinsonianos.

8. REFERÊNCIAS

- ANDRUSKA, K. M.; RACETTE, A. B. Neuromythology of Manganism. **Curr Epidemiol Rep**, v. 2, n. 2, p. 143-148, 2015.
- ASCHNER, M.; ASCHNER, J. L. Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood-brain barrier transport. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 15, n. 3, p. 333-40, 1991.
- ASCHNER, M. *et al.* . Manganese and its role in Parkinson's disease: from transport to neuropathology. **Neuromolecular Med**, v. 11, n. 4, p. 252-66, 2009.
- AVILA, D. S. *et al.* . A possible neuroprotective action of a vinyllic telluride against Mn-induced neurotoxicity. **Toxicol Sci**, v. 115, n. 1, p. 194-201, 2010.
- BAGGA, P.; PATEL, A. B. Regional cerebral metabolism in mouse under chronic manganese exposure: implications for manganism. **Neurochem Int**, v. 60, n. 2, p. 177-85, 2012.
- BAKTHAVATSALAM, S. *et al.* . A zebrafish model of manganism reveals reversible and treatable symptoms that are independent of neurotoxicity. **Dis Model Mech**, v. 7, n. 11, p. 1239-51, 2014.
- BALASZ, M. *et al.* . Perinatal manganese exposure and hydroxyl radical formation in rat brain. **Neurotox Res**, v. 27, n. 1, p. 1-14, 2015.
- BATASSINI, C. *et al.* . Striatal Injury with 6-OHDA Transiently Increases Cerebrospinal GFAP and S100B. **Neural Plast**, v. 2015, p. 387028, 2015.
- BOUABID, S. *et al.* . Manganese Neurotoxicity: behavioral disorders associated with dysfunctions in the basal ganglia and neurochemical transmission. **J Neurochem**, 2015.
- BURTON, N. C. *et al.* . Effects of chronic manganese exposure on glutamatergic and GABAergic neurotransmitter markers in the nonhuman primate brain. **Toxicol Sci**, v. 111, n. 1, p. 131-9, 2009.

CARDOSO, F. Tratamento da Doença de Parkinson. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 53 (1), p. 1-10, 1995.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 484-90, 1985.

CASSINA, A.; RADI, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Arch Biochem Biophys**, v. 328, n. 2, p. 309-16, 1996.

CERSOSIMO, M. G.; KOLLER, W. C. The diagnosis of manganese-induced parkinsonism. **Neurotoxicology**, v. 27, n. 3, p. 340-6, 2006.

CHEN, P. *et al.* . Manganese homeostasis in the nervous system. **J Neurochem**, v. 134, n. 4, p. 601-10, 2015.

CHIN-CHAN, M.; NAVARRO-YEPES, J.; QUINTANILLA-VEGA, B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 124, 2015.

CHTOUROU, Y. *et al.* . Silymarin, a natural antioxidant, protects cerebral cortex against manganese-induced neurotoxicity in adult rats. **Biomaterials**, v. 23, n. 6, p. 985-96, 2010.

COLLE, D. *et al.* . Probucol increases striatal glutathione peroxidase activity and protects against 3-nitropropionic acid-induced pro-oxidative damage in rats. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e67658, 2013.

CORDOVA, F. M. *et al.* . In vivo manganese exposure modulates Erk, Akt and Darpp-32 in the striatum of developing rats, and impairs their motor function. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33057, 2012.

DESOLE, M. S. *et al.* . Cellular defence mechanisms in the striatum of young and aged rats subchronically exposed to manganese. **Neuropharmacology**, v. 34, n. 3, p. 289-95, 1995.

DHANUSHKODI, A. *et al.* . A single intramuscular injection of rAAV-mediated mutant erythropoietin protects against MPTP-induced parkinsonism. **Genes Brain Behav**, v. 12, n. 2, p. 224-33, 2013.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, n. 1, p. 70-7, 1959.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochem Res**, v. 25, n. 9-10, p. 1439-51, 2000.

ERIKSON, K. M. *et al.* . Manganese neurotoxicity: a focus on the neonate. **Pharmacol Ther**, v. 113, n. 2, p. 369-77, 2007.

EVREN, V. *et al.* . Protective effect of edaravone against manganese-induced toxicity in cultured rat astrocytes. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 40, n. 2, p. 563-567, 2015.

EXIL, V. *et al.* . Activation of MAPK and FoxO by manganese (Mn) in rat neonatal primary astrocyte cultures. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e94753, 2014.

FISCHER, J. C. *et al.* . Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clin Chim Acta**, v. 153, n. 1, p. 23-36, 1985.

FIX, J. D. **Neuroanatomy (Lippincott Williams & Wilkins)**. 2008. 274-281

GABRIEL, D. *et al.* . Effects of subchronic manganese chloride exposure on tambaqui (*Colossoma macropomum*) tissues: oxidative stress and antioxidant defenses. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 64, n. 4, p. 659-67, 2013.

GADOTH, N. The accuracy of diagnosis of Parkinson's disease. **Isr Med Assoc J**, v. 4, n. 2, p. 123-4, 2002.

GOLUB, M. S. *et al.* . Neurobehavioral evaluation of rhesus monkey infants fed cow's milk formula, soy formula, or soy formula with added manganese. **Neurotoxicol Teratol**, v. 27, n. 4, p. 615-27, 2005.

GONZALEZ, L. E. *et al.* . Manganese activates the mitochondrial apoptotic pathway in rat astrocytes by modulating the expression of proteins of the Bcl-2 family. **Neurochem Int**, v. 53, n. 6-8, p. 408-15, 2008.

GUILARTE, T. R. Manganese and Parkinson's disease: a critical review and new findings. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 8, p. 1071-80, 2010.

HAMAI, D.; BONDY, S. C. Oxidative basis of manganese neurotoxicity. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1012, p. 129-41, 2004.

HAUBER, W.; LUTZ, S.; MUNKLE, M. The effects of globus pallidus lesions on dopamine-dependent motor behaviour in rats. **Neuroscience**, v. 86, n. 1, p. 147-57, 1998.

HAZELL, A. S. *et al.* . Alzheimer type II astrocytic changes following sub-acute exposure to manganese and its prevention by antioxidant treatment. **Neurosci Lett**, v. 396, n. 3, p. 167-71, 2006.

HUANG, P. *et al.* . Manganese effects in the liver following subacute or subchronic manganese chloride exposure in rats. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 74, n. 4, p. 615-22, 2011.

KOMPOLITI, K., METMAN, L. V. **Encyclopedia of Movement Disorders**. 2010. 155-159 Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=9OMOfuKosgC&pg=RA1-PA158&lpg=RA1-PA158&dq=manganism+irreversible&source=bl&ots=pSSfPHIDbK&sig=o3pB6ivpQgkr7UN8BxrcsoMe8FM&hl=pt-BR&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=manganism%20irreversible&f=false>.

LATINI, A. *et al.* . Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. **Mol Genet Metab**, v. 86, n. 1-2, p. 188-99, 2005.

LAZRISHVILI, I. L. *et al.* . Morphological changes and manganese content in the brains of rat pups subjected to subchronic poisoning with manganese chloride. **Neurosci Behav Physiol**, v. 39, n. 1, p. 7-12, 2009.

LOWRY, O. H. *et al.* . Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LUCCHINI, R. G.; MARTIN, C. J.; DONEY, B. C. From manganism to manganese-induced parkinsonism: a conceptual model based on the evolution of exposure. **Neuromolecular Med**, v. 11, n. 4, p. 311-21, 2009.

MA, T. P., HAINES, D. E. . **Fundamental of Neuroscience**. 1997. 363-378

MA, X. *et al.* . Involvement of dysregulated Wip1 in manganese-induced p53 signaling and neuronal apoptosis. **Toxicol Lett**, v. 235, n. 1, p. 17-27, 2015.

MADDIRALA, Y.; TOBWALA, S.; ERCAL, N. N-acetylcysteineamide protects against manganese-induced toxicity in SHSY5Y cell line. **Brain Res**, v. 1608, p. 157-66, 2015.

MARRAS, C.; GOLDMAN, S. M. Genetics meets environment: evaluating gene-environment interactions in neurologic diseases. **Semin Neurol**, v. 31, n. 5, p. 553-61, 2011.

MARTINEZ-FINLEY, E. J. *et al.* . Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med**, v. 62, p. 65-75, 2013.

MCMILLAN, D. E. A brief history of the neurobehavioral toxicity of manganese: some unanswered questions. **Neurotoxicology**, v. 20, n. 2-3, p. 499-507, 1999.

MELO, L. M.; BARBOSA, E. R.; CARAMELLI, P. Declínio cognitivo e demência associados à doença de Parkinson: características clínicas e tratamento. **Rev. Psiqu. Clín.**, v. 34 (4), p. 176-183, 2007.

MENON, A. V.; CHANG, J.; KIM, J. Mechanisms of divalent metal toxicity in affective disorders. **Toxicology**, v. 339, p. 58-72, 2016.

MICHALKE, B. *et al.* . An approach for manganese biomonitoring using a manganese carrier switch in serum from transferrin to citrate at slightly elevated manganese concentration. **J Trace Elem Med Biol**, v. 32, p. 145-54, 2015.

MILATOVIC, D. *et al.* . Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 240, n. 2, p. 219-25, 2009.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p. 3170-5, 1972.

MIZOGUCHI, K. *et al.* . Chronic stress impairs rotarod performance in rats: implications for depressive state. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 71, n. 1-2, p. 79-84, 2002.

MOHANASUNDARI, M. *et al.* . Enhanced neuroprotective effect by combination of bromocriptine and Hypericum perforatum extract against MPTP-induced neurotoxicity in mice. **J Neurol Sci**, v. 249, n. 2, p. 140-4, 2006.

MOLINA, R. M. *et al.* . Ingestion of Mn and Pb by rats during and after pregnancy alters iron metabolism and behavior in offspring. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 4, p. 413-22, 2011.

MORELLO, M. *et al.* . Sub-cellular localization of manganese in the basal ganglia of normal and manganese-treated rats An electron spectroscopy imaging and electron energy-loss spectroscopy study. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 1, p. 60-72, 2008.

NAGASHIMA, Y. *et al.* . Effects of soybean ingestion on pharmacokinetics of levodopa and motor symptoms of Parkinson's disease - In relation to the effects of Mucuna pruriens. **J Neurol Sci**, v. 361, p. 229-34, 2016.

NOLTE, J. **The Human Brain: An Introduction to its Functional Anatomy**. Mosby, 2008.

O'NEAL, S. L. *et al.* . Subacute manganese exposure in rats is a neurochemical model of early manganese toxicity. **Neurotoxicology**, v. 44, p. 303-13, 2014.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351-8, 1979.

ORDONEZ-LIBRADO, J. L. *et al.* . Manganese inhalation as a Parkinson disease model. **Parkinsons Dis**, v. 2011, p. 612989, 2010.

PERES, T. V. *et al.* . Developmental exposure to manganese induces lasting motor and cognitive impairment in rats. **Neurotoxicology**, v. 50, p. 28-37, 2015.

RACETTE, B. A. Manganism in the 21st century: the Hanninen lecture. **Neurotoxicology**, v. 45, p. 201-7, 2014.

RAMA RAO, K. V. *et al.* . Manganese induces cell swelling in cultured astrocytes. **Neurotoxicology**, v. 28, n. 4, p. 807-12, 2007.

ROBISON, G. *et al.* . Identification of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta as a target of manganese accumulation. **Metalomics**, v. 7, n. 5, p. 748-55, 2015.

ROTH, J. A. Are there common biochemical and molecular mechanisms controlling manganism and parkinsonism. **Neuromolecular Med**, v. 11, n. 4, p. 281-96, 2009.

ROTH, J. A.; EICHHORN, M. Down-regulation of LRRK2 in control and DAT transfected HEK cells increases manganese-induced oxidative stress and cell toxicity. **Neurotoxicology**, v. 37, p. 100-7, 2013.

SANTOS, D. *et al.* . The inhibitory effect of manganese on acetylcholinesterase activity enhances oxidative stress and neuroinflammation in the rat brain. **Toxicology**, v. 292, n. 2-3, p. 90-8, 2012.

SANTOS, D. B. *et al.* . Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid beta peptide in mice. **Exp Neurol**, v. 233, n. 2, p. 767-75, 2012.

SCHALLERT, T., WOODLEE, M., FLEMING, S. Disentangling multiple types of recovery from brain injury. In: J. KRIEGLSTEIN, A. S. K. E. (Ed.). **Pharmacology of Cerebral Ischemia**. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 2002. p.201-216.

SIDORYK-WEGRZYNOWICZ, M.; ASCHNER, M. Manganese toxicity in the central nervous system: the glutamine/glutamate-gamma-aminobutyric acid cycle. **J Intern Med**, v. 273, n. 5, p. 466-77, 2013.

SIKK, K. *et al.* . Manganese-Induced Parkinsonism due to Ephedrone Abuse. **Parkinsons Dis**, v. 2011, p. 865319, 2011.

SRIRAM, K. *et al.* . Modifying welding process parameters can reduce the neurotoxic potential of manganese-containing welding fumes. **Toxicology**, v. 328, p. 168-78, 2015.

SU, C. *et al.* . Chronic exposure to manganese sulfate leads to adverse dose-dependent effects on the neurobehavioral ability of rats. **Environ Toxicol**, 2015.

WEISS, B. Lead, manganese, and methylmercury as risk factors for neurobehavioral impairment in advanced age. **Int J Alzheimers Dis**, v. 2011, p. 607543, 2010.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 325-33, 1981.

YALCIN, A. *et al.* . Evaluation of Cardiac Autonomic Functions in Older Parkinson's Disease Patients: a Cross-Sectional Study. **Aging Dis**, v. 7, n. 1, p. 28-35, 2016.

YANG, Y. *et al.* . Intrastratial manganese chloride exposure causes acute locomotor impairment as well as partial activation of substantia nigra GABAergic neurons. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 31, n. 1, p. 171-8, 2011.

ZECCA, L. *et al.* . Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. **Mol Pathol**, v. 54, n. 6, p. 414-8, 2001.

ZHANG, H. T. *et al.* . Comparison of adult neurospheres derived from different origins for treatment of rat spinal cord injury. **Neurosci Lett**, v. 458, n. 3, p. 116-21, 2009.

ZHANG, S.; FU, J.; ZHOU, Z. In vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain. **Toxicol In Vitro**, v. 18, n. 1, p. 71-7, 2004.